

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 543 222**

51 Int. Cl.:

C12N 15/115 (2010.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

C07K 1/22 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.09.2009** **E 09816140 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.04.2015** **EP 2354225**

54 Título: **Aptámero para NGF y uso del mismo**

30 Prioridad:

24.09.2008 JP 2008244982

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.08.2015

73 Titular/es:

RIBOMIC INC. (50.0%)
16-13, Shirokanedai 3-chome, Minato-ku
Tokyo 108-0071, JP y
FUJIMOTO PHARMACEUTICAL CORPORATION
(50.0%)

72 Inventor/es:

JIN, LING;
MIYAKAWA, SHIN;
FUJIWARA, MASATOSHI;
NAKAMURA, YOSHIKAZU y
HIRAMATSU, HISANAO

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 543 222 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Aptámero para NGF y uso del mismo

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a las realizaciones caracterizadas en las reivindicaciones, específicamente a un aptámero para NGF como el que se define en las reivindicaciones.

Técnica anterior

10 El factor de crecimiento nervioso (NGF) es la cebadora neurotrofina identificada en 1951, y es una importante proteína secretora implicada en el desarrollo y la supervivencia de neuronas periféricas y centrales. Consiste en 118 aminoácidos, tiene un peso molecular de 13 kDa, y tiene enlaces S-S en 3 posiciones en una molécula. BDNF, NT-3 y NT-4/5 están presentes en las proteínas de la familia, que están estructuralmente bien conservadas y forman un homodímero por medio de un enlace no covalente. Tiene una estructura en lámina β orientada en tres direcciones diferentes, y se considera que está dimerizada en esta parte. También tiene cuatro estructuras en bucle con una baja homología entre las familias, y se considera que estas partes definen la especificidad por los receptores.

15 En cuanto a los receptores de NGF, se conocen el receptor de tipo tirosina-quinasa TrkA con una elevada afinidad y p75 con una baja afinidad que pertenece a un superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral. Estos receptores actúan como un homodímero o un heterodímero y están profundamente implicados en el desarrollo y mantenimiento del sistema nervioso central. TrkA es un receptor transmembrana de un solo paso y tiene una estructura de tirosina quinasa en el dominio intracelular. Cuando NGF se une, se produce la fosforilación de la tirosina, se transmite la señal aguas abajo, y se producen la promoción de la diferenciación y el mantenimiento de la supervivencia de la célula.

20 En cuanto a los receptores de la familia se conocen TrkA, TrkB y TrkC. TrkB se une a BDNF y NT-4/5, y TrkC se une a NT-3. p75 muestra una especificidad de ligando inferior en comparación con TrkA y también se une a BDNF, NT-3 y NT-4/5 además de a NGF. Si bien p75 es un receptor transmembrana de un solo paso, no tiene un dominio tirosina quinasa en el lado citoplásmico. Como TrkA, se expresa no solamente en las células nerviosas sino también en las células no nerviosas. Se sabe que este receptor está implicado en la promoción de la diferenciación y el mantenimiento de la supervivencia de la célula, así como que está relacionado con la inducción de la apoptosis y la migración celular. Los resultados del análisis de la estructura cristalina han sugerido que un homodímero de NGF se une a TrkA a 2:2 y a p75 a 2:1. A veces un homodímero de NGF se une a un heterodímero de TrkA y p75.

25 El NGF es producido por las células de Schwann, las células queratinizadas, las células epiteliales bronquiales, los fibroblastos, los linfocitos T, los macrófagos, los mastocitos, los linfocitos B, los queratinocitos, las células de la musculatura lisa, las células glomerulares renales, las células del músculo esquelético y similares. Por otra parte, se sabe que TrkA es expresado en células nerviosas, así como en monocitos, linfocitos T, linfocitos B y mastocitos distintos de las células nerviosas. De un modo similar, p75 es expresado en células nerviosas así como en células no nerviosas.

35 Es bien sabido que el NGF juega un papel clave en el sistema nervioso. Se ha aclarado que el NGF tiene una acción de mantenimiento de la supervivencia de las neuronas colinérgicas y se considera que está relacionado de alguna manera con la enfermedad de Alzheimer. Además, puesto que la administración intracerebral de NGF mejora los trastornos de la memoria de ratas de edad avanzada, también se espera que sea un fármaco terapéutico para la demencia senil.

40 Se ha descubierto que el NGF también actúa sobre los tejidos y las células distintos del sistema nervioso, y está implicado en la defensa del organismo y en el proceso de reparación tisular. Por ejemplo, se sabe que la administración de NGF a un animal incrementa la permeabilidad de los vasos sanguíneos, potencia las respuestas inmunitarias de las células T y las células B, induce la diferenciación de linfocitos, induce el crecimiento de los mastocitos, induce la liberación de diversas citoquinas desde los mastocitos y similares.

45 El NGF está relacionado con la inflamación, y se ha observado un incremento de la expresión de NGF en pacientes con enfermedades inflamatorias y en modelos inflamatorios en animales. Son ejemplos de las mismas el lupus eritematoso generalizado, esclerosis múltiple, psoriasis, artritis, cistitis intersticial, asma y similares. Se ha informado de que el fluido sinovial de pacientes con artritis reumatoide muestra una mayor concentración de NGF. Además, se ha informado sobre el aumento de expresión de NGF en ratas modelo de artritis reumatoide, y sobre un incremento en los mastocitos y un incremento en la expresión de NGF en ratón modelo de artritis.

50 El NGF está profundamente implicado en el dolor. Cuando el NGF se administra subcutáneamente a seres humanos, se producen un dolor profundo tal como dolor muscular continuo durante varios días, e hiperalgesia del lugar de la inyección. Los ratones con el gen de NGF desactivado y los ratones con el gen de TrkA desactivado carecen de nervios desmielinizados y no sienten dolor. Cuando el NGF se administra intraperitonealmente a 1 mg/kg a una rata madura, se produce hiperalgesia frente a estímulos de calor nocivo y mecánicos. El ratón transgénico para NGF muestra hiperalgesia que no está acompañada de afecciones inflamatorias. Además, se sabe que el gen

de TrkA de pacientes con insensibilidad congénita al dolor con anhidrosis (CIPA) tiene anomalías, y la sensación de dolor disminuye cuando el gen de NGF tiene anomalías.

A partir de lo anterior, se puede utilizar un inhibidor de NGF como fármaco terapéutico para el dolor tal como el dolor nociceptivo, el dolor inflamatorio, el dolor neuropático, el dolor carcinomatoso, el dolor por fibromialgia y similares. Se ha informado sobre una terapia combinada de anticuerpo contra NGF y AINE (Documento WO04/073653), una terapia combinada de anticuerpo contra NGF y analgésico opioide (Documento WO04/096122), un método de tratamiento del dolor post-quirúrgico utilizando un anticuerpo contra NGF (Documentos WO04/032870, WO05/000194), un método de tratamiento del dolor de cáncer de hueso utilizando un anticuerpo contra NGF (Documento WO05/111077), y un método de tratamiento del dolor de la osteoartritis utilizando un anticuerpo contra NGF (Documento WO06/110883).

El Tanezumab (PF-4383119 o RN624) es un anticuerpo contra NGF, muestra efecto en el experimento de modelo de dolor utilizando un modelo animal de osteoartritis, y está actualmente en ensayo clínico. Si bien la presencia o ausencia de actividad inhibidora de NGF y receptor de NGF es desconocida, existe un informe referente al ARN natural que se une a NGF (documento no de patente 1).

En los últimos años, han llamado la atención las aplicaciones de los aptámeros de ARN para medicamentos, agentes de diagnóstico, y fármacos de ensayo; algunos aptámeros de ARN ya han estado en fase de estudio clínico o en uso práctico. En Diciembre de 2004, el cebador fármaco de aptámero de ARN del mundo, Macugen, fue aprobado como fármaco terapéutico para la degeneración macular relacionada con la edad en los Estados Unidos. Un aptámero de ARN hace referencia a un ARN que se une específicamente a una molécula diana tal como una proteína, y se puede preparar utilizando el método SELEX (Evolución Sistemática de Ligandos mediante Enriquecimiento Exponencial) (Referencias de Patente 1 - 3). En el método SELEX, se selecciona un ARN que se une específicamente a una molécula diana de una reserva de ARN con aproximadamente 10^{14} secuencias de nucleótidos diferentes. La estructura de ARN utilizada tiene una secuencia al azar de aproximadamente 40 residuos, que está flanqueada por secuencias de cebadores. Se permite que esta reserva de ARN se ensamble con una sustancia diana, y solamente el ARN que se ha unido a la sustancia diana se recoge utilizando un filtro y similares. El ARN recogido se amplifica mediante RT-PCR, y esto se utiliza como molde para la siguiente ronda. Repitiendo esta operación aproximadamente 10 veces, se puede obtener aptámero de ARN que se une específicamente a la sustancia diana.

Los fármacos de aptámeros, como los fármacos de anticuerpos, se pueden dirigir a factores extracelulares. Con referencia a muchas publicaciones científicas y otros materiales de referencia de dominio público, se considera que los fármacos de aptámeros superan potencialmente a los fármacos de anticuerpos en ciertos aspectos. Por ejemplo, los aptámeros a menudo muestran una fuerza de unión superior y una especificidad superior que los anticuerpos. Es poco probable que los aptámeros experimenten eliminación inmunitaria, y es difícil que se produzcan reacciones adversas características de los anticuerpos, tales como la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC) y la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), con el uso de aptámeros. Desde el aspecto de la liberación, puesto que los aptámeros tienen aproximadamente 1/10 del tamaño de los anticuerpos, la liberación de un fármaco en el sitio objetivo es más fácil. Puesto que los aptámeros son producidos por síntesis química, se pueden realizar fácilmente diversas modificaciones, es posible la reducción del coste por medio de la producción a gran escala. Mientras, las vidas medias en sangre de los aptámeros son generalmente más cortas que las de los anticuerpos; sin embargo, esta propiedad es a veces ventajosa en vista de la toxicidad. Estos hechos conducen a la conclusión de que incluso cuando se dirigen a la misma molécula, los fármacos de aptámeros superan potencialmente a los fármacos de anticuerpos.

[Lista de Documentos]

[Documentos de patente]

Documento de patente 1: WO91/19813

Documento de patente 2: WO94/08050

Documento de patente 3: WO95/07364

[Documentos no de patente]

Documento no de patente 1: Binkley J et al., (1995) Nucleic Acids Res, 23, 3198-3205

[Compendio de la Invención]

Problemas que va a resolver la invención

La presente invención se refiere a las realizaciones caracterizadas en las reivindicaciones. Específicamente, la invención está dirigida a proporcionar un aptámero para NGF como se define en las reivindicaciones.

Medios para resolver los problemas

Los autores de la presente invención investigaron diligentemente para resolver el problema descrito anteriormente y consiguieron preparar un aptámero de buena calidad para NGF, lo que dio como resultado la realización de la presente invención.

5 Por consiguiente, la presente invención proporciona lo siguiente:

[1] Un aptámero que se une a NGF e inhibe la unión de NGF a un receptor de NGF como se define en las reivindicaciones;

[2] El aptámero que se une a NGF e inhibe la unión de NGF a un receptor de NGF como se define en las reivindicaciones que inhibe la actividad de crecimiento de neuritas del NGF;

10 [3] El aptámero de acuerdo con el apartado [2], que tiene una concentración inhibidora de 50% (CI50) de no más de 100 nM;

[4] El aptámero de acuerdo con el apartado [2], que tiene una concentración inhibidora de 50% (CI50) de no más de 10 nM;

15 [5] El aptámero de acuerdo con uno cualquiera de los apartados [1] o [2], que comprende una secuencia mostrada por UGAAAAAAACY (SEQ ID NO: 110), UGAAAGAAACY (SEQ ID NO: 111), CGAACAAAACY (SEQ ID NO: 112) o CGAAAGAAACY (SEQ ID NO: 113), en donde Y es un nucleótido de pirimidina y al menos un nucleótido de la secuencia mencionada anteriormente está modificado;

20 [6] El aptámero de acuerdo con uno cualquiera de los apartados [1] a [5], en donde los grupos hidroxilo de la posición 2' de una ribosa de los respectivos nucleótidos de pirimidina son iguales o diferentes y están no remplazados o remplazados por un átomo o grupo seleccionados del grupo que consiste en un átomo de hidrógeno, un átomo de flúor y un grupo metoxi;

25 [7] El aptámero de acuerdo con uno cualquiera de los apartados [1] a [5], en donde los grupos hidroxilo de la posición 2' de la ribosa de los respectivos nucleótidos de purina son iguales o diferentes y está no remplazados o remplazados por un átomo o grupo seleccionados del grupo que consiste en un átomo de hidrógeno, un átomo de flúor y un grupo metoxi;

[8] El aptámero de acuerdo con el apartado [1], que comprende la secuencia de nucleótidos (a) de más abajo:

(a) un aptámero que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada entre los SEQ ID NO: 1-9, 12, 24-55 y 57-90 (en donde uracilo puede ser timina);

[9] El aptámero de acuerdo con el apartado [8], en donde al menos uno de los nucleótidos ha sido modificado;

30 [10] El aptámero de acuerdo con el apartado [9], en donde los grupos hidroxilo de la posición 2' de los respectivos nucleótidos de pirimidina son iguales o diferentes y están no remplazados o remplazados por un átomo o un grupo seleccionados del grupo que consiste en un átomo de hidrógeno, un átomo de flúor y un grupo metoxi;

35 [11] El aptámero de acuerdo con el apartado [9], en donde los grupos hidroxilo de la posición 2' de los respectivos nucleótidos de purina son iguales o diferentes y están no remplazados o remplazados por un átomo o un grupo seleccionados del grupo que consiste en un átomo de hidrógeno, un átomo de flúor y un grupo metoxi;

[12] Se describe adicionalmente un complejo que comprende el aptámero de uno cualquiera de los apartados [1] a [11] y una sustancia funcional;

[13] El complejo de acuerdo con el apartado [12], en donde la sustancia funcional es una sustancia de afinidad, una sustancia de marcaje, una enzima, un vehículo de liberación de fármaco o un fármaco;

40 [14] Un medicamento que comprende el aptámero de uno cualquiera de los apartados [1] a [11];

[15] Un agente anti-doloroso que comprende el aptámero de uno cualquiera de los apartados [1] a [11];

[16] Un agente anti-inflamatorio que comprende el aptámero de uno cualquiera de los apartados [1] a [11];

[17] Asimismo se describe un agente de diagnóstico que comprende el aptámero de uno cualquiera de los apartados [1] a [11] o el complejo del apartado [12] o [13];

45 [18] Se describe adicionalmente una sonda para la detección de NGF, que comprende el aptámero de uno cualquiera de los apartados [1] a [11] o el complejo del apartado [12] o [13];

[19] Se describe adicionalmente un portador en fase sólida para la purificación de NGF, que comprende el aptámero de uno cualquiera de los apartados [1] a [11] o el complejo del apartado [12] o [13];

[20] Se describe adicionalmente un método de detección de NGF, que comprende la utilización del aptámero de uno cualquiera de los apartados [1] a [11] o el complejo del apartado [12] o [13];

[21] Se describe adicionalmente un método de purificación de NGF, que comprende la utilización del aptámero de uno cualquiera de los apartados [1] a [11] o el complejo del apartado [12] o [13];

5 [22] Además se describe un método de tratamiento o prevención de una enfermedad que está acompañada de dolor o inflamación, que comprende administrar el aptámero de uno cualquiera de los apartados [1] a [11];

[23] El uso del aptámero de uno cualquiera de los apartados [1] a [11] para un medicamento para el tratamiento o la profilaxis de una enfermedad que está acompañada de dolor o inflamación;

10 [24] El uso del aptámero de uno cualquiera de los apartados [1] a [11] para su uso como medicamento para el tratamiento o la profilaxis de una enfermedad que está acompañada de dolor o inflamación;

[25] El uso del aptámero de uno cualquiera de los apartados [1] a [11] para su uso como medicamento para el tratamiento o la profilaxis de una enfermedad que está acompañada de dolor o inflamación;

[26] El uso del aptámero de uno cualquiera de los apartados [1] a [11] para la producción de un medicamento para el tratamiento o la profilaxis de una enfermedad que está acompañada de dolor o inflamación.

15 **Efecto de la invención**

El aptámero de la presente invención puede ser útil como medicamento, agente de diagnóstico o reactivos para enfermedades tales como dolor, enfermedad inflamatoria y similares. El aptámero de la presente invención también puede ser útil para la purificación y la concentración de NGF, así como para la detección y cuantificación de NGF.

Breve descripción de los dibujos

20 La Fig. 1 muestra la estructura secundaria del aptámero mostrado por el SEQ ID NO: 1 pronosticada por el programa MFOLD, en donde la parte incluida en el círculo de color negro muestra una secuencia consenso.

La Fig. 2 muestra la estructura secundaria del aptámero mostrado por el SEQ ID NO: 2 pronosticada por el programa MFOLD

25 La Fig. 3 muestra la estructura secundaria del aptámero mostrado por el SEQ ID NO: 3 pronosticada por el programa MFOLD, en donde la parte incluida en el círculo de color negro muestra una secuencia consenso.

La Fig. 4 muestra la estructura secundaria del aptámero mostrado por el SEQ ID NO: 4 pronosticada por el programa MFOLD, en donde la parte incluida en el círculo de color negro muestra una secuencia consenso.

La Fig. 5 muestra la estructura secundaria del aptámero mostrado por el SEQ ID NO: 5 pronosticada por el programa MFOLD, en donde parte incluida en el círculo de color negro muestra una secuencia consenso.

30 La Fig. 6 muestra la estructura secundaria del aptámero mostrado por el SEQ ID NO: 6 pronosticada por el programa MFOLD, en donde la parte incluida en el círculo de color negro muestra una secuencia consenso.

La Fig. 7 muestra la estructura secundaria del aptámero mostrado por el SEQ ID NO: 7 pronosticada por el programa MFOLD, en donde la parte incluida en el círculo de color negro muestra una secuencia consenso.

35 La Fig. 8 muestra la estructura secundaria del aptámero mostrado por el SEQ ID NO: 8 pronosticada por el programa MFOLD.

La Fig. 9 muestra la estructura secundaria del aptámero mostrado por el SEQ ID NO: 9 pronosticada por el programa MFOLD, en donde la parte incluida en el círculo de color negro muestra una secuencia consenso.

La Fig. 10a muestra la estructura secundaria del aptámero mostrado por el SEQ ID NO: 12 pronosticada por el programa MFOLD.

40 La Fig. 10b muestra la estructura secundaria del aptámero mostrado por el SEQ ID NO: 12 pronosticada por el programa MFOLD.

La Fig. 11 es un sensograma que muestra que el aptámero (Apt) mostrado por el SEQ ID NO: 6 se une a NGF humano, en donde 40N es un ARN que contiene una secuencia al azar con 40 nucleótidos. Utilizando, como ligando, Apt o 40N como control negativo, y NGF humano como analito, la medición se realizó por medio de BIAcore2000
45 fabricado por BIAcore.

La Fig. 12 es un dibujo que muestra que el aptámero (Apt) mostrado por el SEQ ID NO: 6 inhibe la unión de NGF humano y el receptor TrkA humano, en donde 40N es un ARN que contiene una secuencia al azar con 40 nucleótidos. Utilizando TrkA como ligando, una mezcla de NGF y Apt como analito, NGF solo como control negativo,

y una mezcla de NGF y 40N, se llevó a cabo la medición por medio de BIAcore2000 fabricado por BIAcore.

La Fig. 13 es un dibujo que muestra que el aptámero (Apt) mostrado por el SEQ ID NO: 6 inhibe la unión de NGF humano y receptor P75 humano, en donde 40N es un ARN que contiene una secuencia al azar con 40 nucleótidos. Utilizando TrkA como ligando, una mezcla de NGF y Apt como analito, NGF solo como control negativo, y una mezcla de NGF y 40N, se llevó a cabo la medición por medio de BIAcore2000 fabricado por BIAcore.

La Fig. 14 muestra la estructura secundaria del aptámero mostrado por el SEQ ID NO: 31 pronosticada por el programa MFOLD, en donde la parte incluida en el círculo de color negro muestra una secuencia consenso.

La Fig. 15 muestra la estructura secundaria del aptámero mostrado por el SEQ ID NO: 36 pronosticada por el programa MFOLD, en donde la parte incluida en el círculo de color negro muestra una secuencia consenso.

10 [Descripción de las realizaciones]

La presente invención proporciona un aptámero como se define en las reivindicaciones que tiene una actividad de unión a NGF. El aptámero de la presente invención se une a NGF, y puede inhibir la actividad de NGF inhibiendo la unión de NGF y el receptor de NGF.

Un aptámero se refiere a una molécula de ácido nucleico que tiene una afinidad de unión por una molécula diana concreta. El aptámero puede inhibir la actividad de una molécula diana concreta mediante la unión a la molécula diana concreta. El aptámero de la presente invención puede ser un ARN, un ADN, un ácido nucleico modificado o una mezcla de los mismos. El aptámero de la presente invención también puede estar en una forma lineal o circular.

NGF es una neurotrofina conocida, y es una proteína secretora importante implicada en el desarrollo y la supervivencia de las neuronas periféricas y centrales. NGF es una abreviatura de Factor de Crecimiento Nervioso. En la presente invención, NGF significa concretamente un tipo β de NGF. Las secuencias de aminoácidos del β -NGF humano son las que se muestran por los Números de Acceso NP002497, P01138, AAI26151, AAI26149 y CAB75625, que también pueden ser una con una mutación, su dominio o péptido. Puede ser no sólo un monómero, sino también un dímero o multímero.

El aptámero de la presente invención se une a NGF en un tampón fisiológico (por ejemplo, disolución A: véase el Ejemplo 1). El aptámero de la presente invención se une a NGF a una intensidad detectable por medio del siguiente ensayo.

Para la medición, se utiliza BIAcore 2000 fabricado por BIAcore. Se inmoviliza un aptámero sobre un chip sensor. La cantidad que se va a inmovilizar se establece en 1000 UR. Se utiliza un tampón fisiológico que contiene NaCl 0,3 M (disolución A: véase el Ejemplo 1) para preparar la disolución de NGF (0,5 μ M). Esta disolución de NGF (20 μ l) se inyecta y se detecta la unión de NGF al aptámero. Utilizando ARN que contiene una secuencia de nucleótidos al azar que consiste en 40 nucleótidos como control negativo, cuando el NGF se une significativamente fuertemente al aptámero en comparación con el ARN de control, se evalúa el aptámero para determinar si tiene capacidad de unión a NGF.

El aptámero de la presente invención inhibe la actividad de NGF mediante la unión a NGF y la inhibición de la unión de NGF y el receptor de NGF. En la presente memoria descriptiva, la "actividad inhibitoria frente a NGF" representa una capacidad inhibitoria sobre cualquier actividad que tenga el NGF. Por ejemplo, representa una actividad para impedir que el NGF se una al receptor de NGF.

Además, los ejemplos de otra "actividad inhibitoria de NGF" incluyen la inhibición de la transducción de la señal aguas abajo del receptor de NGF (ruta de Ras-MAP quinasa, ruta de PI3 quinasa), la inhibición del aumento de expresión de TRPV1, SP, BDNF y similares, la actividad inhibitoria de la expresión de HA, BK, PG, NGF y otra citoquina liberada de los mastocitos etc. y similares, que resultan de la unión de NGF al receptor de NGF.

Además, se pueden mencionar la diferenciación de las células nerviosas inducida por NGF, el aumento de la supervivencia, el crecimiento de neuritas y la permeabilidad de los vasos sanguíneos, la mejora de la respuesta inmunitaria de las células T y células B, la diferenciación de los linfocitos, la inhibición del crecimiento y similares de diversas células tales como los mastocitos, las células eritroleucémicas, las células cancerosas y similares, el alivio del dolor, la hiperalgesia y similares.

La "actividad inhibitoria frente a NGF" preferible que tiene el aptámero de la presente invención es una actividad que inhibe la unión de NGF al receptor de NGF, y una actividad que inhibe la actividad de crecimiento de las neuritas inducida por NGF.

En la presente memoria, el "receptor de NGF" se refiere a una proteína de la superficie celular a la que se une el NGF. Como receptores de NGF, se conocen TrkA y p75. El receptor de NGF referido en la presente invención puede ser una proteína que contiene una secuencia de aminoácidos natural o una variante de la misma. Aquí, la "variante de la misma" representa una proteína o péptido en donde varios aminoácidos de una secuencia de aminoácidos del "receptor de NGF" se han reemplazado por una secuencia de aminoácidos parcial de la misma, que tiene una

actividad de unión a NGF e inhibe la unión de NGF y el receptor de NGF.

El aptámero de la presente invención se une a NGF e inhibe la unión de NGF y el receptor de NGF. Mediante el siguiente ensayo se puede evaluar si el aptámero inhibe o no la unión de NGF al receptor de NGF.

Para la medición, se utiliza BIAcore 2000 fabricado por BIAcore. Sobre un chip sensor CM5 se inmoviliza una proteína de fusión de receptor de NGF y Fc (p. ej., Trk A-Fc (175-TK, R&D Systems)) o p75-Fc (R&D Systems)). La cantidad que se va a inmovilizar es de 1100 UR. El NGF (0,1 μ M) y un aptámero (0,33 μ M) se mezclan en un tampón fisiológico (disolución A: véase el Ejemplo 1), y la mezcla se prepara durante 30 min. Esta mezcla (20 μ l) se inyecta, y se detecta la unión de NGF al receptor de NGF. Cuando la actividad inhibidora (%) no es menor de 60%, se evalúa si el aptámero inhibe la unión de NGF al receptor de NGF. La actividad inhibidora (%) se calcula con la cantidad de unión de NGF libre de un aptámero y el receptor de NGF como 0, y una cantidad de unión mediante inyección de una disolución libre de NGF como 100. Aquí, la cantidad de unión significa el valor UR en la parte superior de un pico del sensograma de BIAcore (valor UR inmediatamente después de la finalización de la inyección de NGF).

En una realización, el aptámero de la presente invención puede inhibir tanto la unión de NGF y TrkA, como la de NGF y p75.

El aptámero de la presente invención puede mostrar actividad inhibitoria frente al NGF derivado de cualquier mamífero. Tales mamíferos incluyen primates (p. ej., seres humanos, monos), roedores (p. ej., ratón, rata y cobaya), y animales de compañía, animales domésticos y animales de trabajo (p. ej., perro, gato, caballo, bóvidos, cápridos, óvidos, suidos).

El aptámero de la presente invención no está particularmente limitado siempre que se una a cualquier porción de NGF y pueda inhibir la unión de NGF y el receptor de NGF.

Se describe un aptámero que contiene una secuencia mostrada por HGAANNANCY (SEQ ID NO: 106) en donde N es cualquier nucleótido, H es un nucleótido con exclusión de G, e Y es un nucleótido de pirimidina, se une a NGF, e inhibe la unión de NGF y el receptor de NGF. La secuencia de nucleótidos mostrada por el SEC ID NO: 106 está incluida en el aptámero que se une a NGF e inhibe la unión de NGF y el receptor de NGF, que se obtiene por medio del método SELEX mencionado a continuación. Al menos un nucleótido de la secuencia anteriormente mencionada está preferiblemente modificado.

Adicionalmente se describe un aptámero que contiene una secuencia consenso mostrada por UGAAANNANCY (SEQ ID NO: 107), CGAANNAAACY (SEQ ID NO: 108) o AGAANNAAACY (SEQ ID NO: 109), en donde N es cualquier nucleótido, e Y es un nucleótido de pirimidina, se une a NGF, e inhibe la unión de NGF y el receptor de NGF. Las secuencias de nucleótidos mostradas por los SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 108 y SEQ ID NO: 109 se incluyen en el aptámero que se une a NGF e inhibe la unión de NGF y el receptor de NGF, que se obtiene por medio del método SELEX mencionado a continuación. Al menos un nucleótido de estas secuencias está preferiblemente modificado.

El aptámero de la presente invención contiene una secuencia consenso mostrada por UGAAAAAAACY (SEQ ID NO: 110), UGAAAGAAACY (SEQ ID NO: 111), CGAACAAAACY (SEQ ID NO: 112) o CGAAAGAAACY (SEQ ID NO: 113) en donde Y es un nucleótido de pirimidina, se une a NGF, e inhibe la unión de NGF y el receptor de NGF. Las secuencias de nucleótidos mostradas por el SEQ ID NO: 110, el SEQ ID NO: 111, el SEQ ID NO: 112 y el SEQ ID NO: 113 se incluyen en el aptámero que se une a NGF e inhibe la unión de NGF y el receptor de NGF, que se obtiene por medio del método SELEX mencionado a continuación. Al menos un nucleótido de estas secuencias está preferiblemente modificado.

Además, el aptámero de la presente invención es un aptámero que se une a NGF e inhibe una actividad de crecimiento de las neuritas de NGF. Se puede evaluar si el aptámero inhibe o no la actividad de crecimiento de las neuritas de NGF por medio del ensayo descrito en el Ejemplo 7 o el Ejemplo 8.

Además, también se puede determinar la concentración de aptámero (CI50) para proporcionar una actividad de crecimiento de las neuritas de 50% mediante la realización del ensayo descrito en el Ejemplo 8 con diferentes concentraciones de aptámero. La CI50 del aptámero de la presente invención es preferiblemente no mayor de 100 nM, más preferiblemente no mayor de 10 nM.

La longitud del aptámero de la presente invención no está limitada, y por lo general puede ser de aproximadamente 10 a aproximadamente 200 nucleótidos, y puede ser, por ejemplo, no mayor de aproximadamente 100 nucleótidos, preferiblemente no mayor de aproximadamente 60 nucleótidos, más preferiblemente no mayor de aproximadamente 50 nucleótidos, más preferiblemente no mayor de aproximadamente 45 nucleótidos. Cuando el número total de nucleótidos es más pequeño, la síntesis química y la producción en masa serán más fáciles, y hay una gran ventaja en términos de coste. También se cree que la modificación química es más fácil, la estabilidad en el organismo es más alta, y la toxicidad es menor.

Cada nucleótido contenido en el aptámero de la presente invención es el mismo o diferente y puede ser un

nucleótido que comprende un grupo hidroxilo en la posición 2' de la ribosa (p. ej., ribosa del nucleótido de pirimidina, ribosa del nucleótido de purina) (es decir, un nucleótido no reemplazado) o un nucleótido reemplazado por cualquier átomo o grupo en la posición 2' de la ribosa. Como ejemplos de cualquiera de tales átomos o grupos, se pueden mencionar un nucleótido reemplazado por un átomo de hidrógeno, un átomo de flúor o un grupo -O-alquilo (p. ej., un grupo -O-Me), un grupo -O-acilo (p. ej., un grupo -O-CHO), o un grupo amino (p. ej., un grupo -NH₂).

El aptámero de la presente invención también puede ser el nucleótido en donde al menos una clase (p. ej., 1, 2, 3 o 4 clases) de nucleótidos comprende un grupo hidroxilo, o cualquier átomo o grupo descritos anteriormente, por ejemplo, al menos dos clases (p. ej., 2, 3 o 4 clases) de grupos seleccionados del grupo que consiste en un átomo de hidrógeno, un átomo de flúor, un grupo hidroxilo y un grupo -O-Me, en la posición 2' de la ribosa.

Asimismo, en el aptámero de la presente invención, todos los nucleótidos de pirimidina son los mismos o diferentes y cada uno puede ser un nucleótido reemplazado por un átomo de flúor, o un nucleótido reemplazado por cualquier átomo o grupo mencionado anteriormente, preferiblemente un átomo o grupo seleccionado del grupo que consiste en un átomo de hidrógeno, un grupo hidroxilo y un grupo metoxi en la posición 2' de la ribosa.

En los aptámeros de la presente invención, por otra parte, todos los nucleótidos de purina son los mismos o diferentes y cada uno puede ser un nucleótido reemplazado por un grupo hidroxilo en la posición 2' de la ribosa, o un nucleótido reemplazado por cualquier átomo o grupo mencionado anteriormente, preferiblemente un átomo o un grupo seleccionado del grupo que consiste en un átomo de hidrógeno, un grupo metoxi, y un átomo de flúor.

El aptámero de la presente invención también puede ser uno en donde todos los nucleótidos comprenden un grupo hidroxilo, o cualquier átomo o grupo mencionado anteriormente, por ejemplo, el grupo idéntico seleccionado del grupo que consiste en un átomo de hidrógeno, un átomo de flúor, un grupo hidroxilo y un grupo -O-Me, en la posición 2' de la ribosa.

En esta memoria descriptiva, se supone que los nucleótidos que constituyen el aptámero son ARN (es decir, se supone que los grupos azúcar son ribosa) en la descripción de cómo los grupos azúcar se modifican en los nucleótidos. Sin embargo, esto no significa que el ADN está exento de nucleótidos que constituyen aptámeros, y una modificación del ARN se debe leer como una modificación de ADN según sea apropiado. Cuando el nucleótido que constituye el aptámero de ADN, por ejemplo, la sustitución del grupo hidroxilo en la posición 2' de la ribosa por X debe leerse como una sustitución de un átomo de hidrógeno en la posición 2' de la desoxirribosa por X.

Un aptámero descrito en la presente memoria también puede ser:

(a) un aptámero que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada entre los SEQ ID NO: 1-9, 12, 24-55 y 57-90 (con la condición de que el uracilo puede ser timina);

(b) un aptámero que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada entre los SEQ ID NO: 1-9, 12, 24-55 y 57-90 (con la condición de que el uracilo puede ser timina), en donde uno o a varios nucleótidos son reemplazados, suprimidos, insertados o añadidos;

(c) un aptámero que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de 70% o más (preferiblemente 80% o más, más preferiblemente 90% o más, lo más preferiblemente 95% o más) con una secuencia de nucleótidos seleccionada entre los SEQ ID NO: 1-9, 12, 24-55 y 57-90 (con la condición de que el uracilo puede ser timina); o

(d) un producto conjugado seleccionado del grupo que consiste en un producto conjugado de una pluralidad de aptámeros del apartado (a) anterior, un producto conjugado de una pluralidad de aptámeros del apartado (b) anterior, un producto conjugado de una pluralidad de aptámeros del apartado (c) anterior, y un producto conjugado de una pluralidad de aptámeros de los apartados (a), (b) y (c) anteriores.

Los aptámeros de los apartados (b) - (d) anteriormente mencionados se pueden unir a NGF y/o inhibir la actividad de NGF (actividad de unión al receptor de NGF etc.).

Además, preferiblemente, los aptámeros de los apartados (b) - (d) mencionados anteriormente se unen a NGF e inhiben la unión de NGF y el receptor de NGF, y/o se unen a NGF, e inhiben la actividad de crecimiento de las neuritas del NGF.

Más preferiblemente, los aptámeros de los apartados (b) - (d) anteriormente mencionados muestran una concentración inhibitoria del crecimiento de las neuritas de NGF de no más de 100 nM, más preferiblemente no más de 10 nM.

En el apartado (b) anterior, el número de nucleótidos reemplazados, suprimidos, insertados o añadidos no está particularmente limitado con tal que el aptámero se una a NGF, y pueda inhibir la actividad de NGF (actividad de unión al receptor de NGF etc.). Este puede ser, por ejemplo, no más de aproximadamente 30, preferiblemente no más de aproximadamente 20, más preferiblemente no más de aproximadamente 10, aún más preferiblemente no más de 5, lo más preferiblemente 4, 3, 2 o 1.

Con respecto al apartado (c) anterior, "una identidad" significa una proporción (%) de residuos de nucleótidos idénticos a todos los residuos de nucleótidos solapantes en el alineamiento óptimo donde dos secuencias de nucleótidos se alinean usando un algoritmo matemático conocido en el campo técnico (preferiblemente, el algoritmo considera la introducción de huecos en una o ambas secuencias para el mejor alineamiento).

5 La identidad de secuencia de nucleótidos en la presente memoria descriptiva se puede calcular, por ejemplo, alineando las dos secuencias de nucleótidos utilizando el algoritmo de cálculo de homología NCBI BLAST-2 (National Center for Biotechnology Information Basic Local Alignment Search Tool) bajo las siguientes condiciones (hueco abierto = 5 penalizaciones; extensión del hueco = 2 penalizaciones; $x_{\text{caída}}$ ("dropoff") = 50; valor esperado = 10; filtrado = ON).

10 En el apartado (d) anterior, la conjugación puede lograrse mediante la unión en tándem. En la conjugación, se puede utilizar un conector. En cuanto al conector, se pueden mencionar cadenas de nucleótidos (p. ej., de 1 a aproximadamente 20 nucleótidos) y cadenas no nucleotídicas (p. ej., conector de $-(CH_2)_n$, conector de

15 $-(CH_2CH_2O)_n$, conector de hexaetilenglicol, conector de TEG, conector que contiene péptido, conector que contiene enlace -SS-, conector que contiene enlace -CONH-, conector que contiene enlace $-OPO_3^-$). La pluralidad mencionada en los productos conjugados plurales descritos anteriormente no está particularmente limitada, siempre y cuando sea de dos o más, y la pluralidad puede ser, por ejemplo, de 2, 3 o 4. Cada uno de los nucleótidos de los apartados (a) a (d) anteriores, ya sean iguales o diferentes, puede ser un nucleótido que comprende un grupo hidroxilo en la posición 2' de la ribosa, o un nucleótido remplazado por cualquier grupo (p. ej., un átomo de hidrógeno, un átomo de flúor o un grupo -O-Me) en la posición 2' de la ribosa (p. ej., la ribosa del nucleótido de pirimidina).

20 El aptámero de la presente invención puede ser uno en donde un residuo de azúcar (p. ej., ribosa) de cada nucleótido ha sido modificado para incrementar la actividad de unión a NGF, la actividad inhibidora de la unión de NGF-receptor de NGF, la actividad inhibidora del crecimiento de las neuritas de NGF, la estabilidad del aptámero, la liberabilidad del fármaco y similares. Como ejemplos de la modificación en un residuo de azúcar, se pueden mencionar el remplazo del átomo de oxígeno en la posición 2', en la posición 3' y/o en la posición 4' del residuo de azúcar por otro átomo, y similares. En cuanto a la clase de modificación, se pueden mencionar fluoración, O-alquilación (p. ej., O-metilación, O-etilación), O-arilación, S-alquilación (p. ej., S-metilación, S-etilación), S-arilación, y aminación (p. ej., $-NH_2$). Tales alteraciones en el residuo de azúcar se pueden realizar mediante un método conocido per se (véanse, por ejemplo, Sproat et al., (1991) Nucl. Acid. Res. 19, 733-738; Cotton et al., (1991) Nucl. Acid. Res. 19, 2629-2635; Hobbs et al., (1973) Biochemistry 12, 5138-5145).

30 El aptámero de la presente invención también puede tener una base de ácido nucleico (p. ej., purina o pirimidina) alterada (p. ej., sustitución química) para aumentar la actividad de unión a NGF, la actividad inhibidora de la unión de NGF al receptor de NGF, la actividad inhibidora del crecimiento de neuritas de NGF y similares. Como ejemplos de tales alteraciones, se pueden mencionar la alteración de la pirimidina en la posición 5, la alteración de la purina en las posiciones 6 y/u 8, la alteración con una amina extracíclica, la sustitución con 4-tiouridina, y la sustitución con 5-bromo- o 5-yodo-uracilo. El grupo fosfato contenido en el aptámero de la presente invención puede ser alterado para conferir resistencia a la nucleasa y a la hidrólisis. Por ejemplo, el grupo $P(O)O$ puede ser reemplazado por $P(O)S$ (tioato), $P(S)S$ (ditioato), $P(O)NR_2$ (amidato), $P(O)R$, $R(O)OR'$, CO o CH_2 (formacetal) o 3'-amina ($-NH-CH_2-CH_2-$) [en donde cada unidad de R o R' es independientemente H o un alquilo remplazado o no reemplazado (p. ej., metilo, etilo)].

El grupo de unión es, por ejemplo, -O-, -N- o -S-, y los nucleótidos se pueden unir a un nucleótido adyacente a través de estos grupos de unión.

Las alteraciones también pueden incluir alteraciones tales como la protección terminal en 3' y 5'.

45 Se puede realizar adicionalmente una alteración añadiendo a un extremo un polietilenglicol, aminoácido, péptido, dT invertida, ácido nucleico, nucleósidos, Miristoilo, Litocólico-oleilo, Docosanilo, Lauroilo, Estearoilo, Palmitoilo, Oleoilo, Linoleoilo, otros lípidos, esteroides, colesterol, cafeína, vitaminas, pigmentos, sustancias fluorescentes, agentes contra el cáncer, toxinas, enzimas, sustancias radiactivas, biotina y similares. Para tales alteraciones, véanse, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos 5.660.985 y 5.756.703.

50 El aptámero de la presente invención se puede sintetizar químicamente como se describe en la presente memoria y por medio de un método conocido per se en la técnica. Un aptámero se une a la molécula diana en una amplia variedad de modos de unión, tales como enlaces iónicos basados en la carga negativa del grupo fosfato, enlaces hidrófobos y enlaces de hidrógeno basados en la ribosa, y enlaces de hidrógeno e interacción de apilamiento basada en bases de ácidos nucleicos. En particular, los enlaces iónicos, basados en la carga negativa del grupo fosfato, que están presentes en el mismo número que el número de nucleótidos constituyentes, son fuertes, y se unen a la lisina y la arginina que están presentes sobre la superficie de la carga positiva de la proteína. Por esta razón, las bases de ácidos nucleicos que no participan en la unión directa a la molécula diana pueden ser sustituidas. En particular, debido a que la región de la estructura de tallo ya ha formado pares de bases y se enfrenta al interior de la estructura de doble hélice, es poco probable que las bases de ácidos nucleicos se unan directamente

a la molécula diana. Por lo tanto, incluso cuando un par de bases es remplazado por otro par de bases, la actividad del aptámero a menudo no disminuye. En las estructuras en donde no se forman pares de bases, tales como las estructuras en bucle, siempre que la base del ácido nucleico no esté involucrada en la unión directa a la molécula diana, es posible la sustitución de la base. En cuanto a las modificaciones de la posición 2' de la ribosa, el grupo funcional en la posición 2' de la ribosa interacciona con poca frecuencia directamente con la molécula diana, pero en muchos casos, no es relevante, y puede ser sustituida por otra molécula modificada. Por lo tanto, un aptámero, a menos que el grupo funcional involucrado en la unión directa a la molécula diana sea sustituido o eliminado, a menudo conserva su actividad. También es importante que la estructura tridimensional general no cambie sustancialmente.

Se puede preparar un aptámero mediante la utilización del método SELEX o una versión mejorada del mismo (p. ej., Ellington et al., (1990) *Nature*, 346, 818-822; Tuerk et al., (1990) *Science*, 249, 505-510). En el método SELEX, al aumentar el número de rondas o el uso de una sustancia competidora, se concentra y se selecciona un aptámero que presenta un potencial de unión más fuerte para la molécula diana. Por lo tanto, ajustando el número de rondas de SELEX y/o cambiando las condiciones de la competición, se pueden obtener en algunos casos aptámeros con diferentes fuerzas de unión, aptámeros con diferentes modos de unión, y aptámeros con la misma fuerza de unión o modo de unión pero diferentes secuencias de bases. El método SELEX comprende un proceso de amplificación por PCR; al causar una mutación mediante el uso de iones de manganeso y similares, en el proceso, es posible llevar a cabo SELEX con una mayor diversidad.

Los aptámeros obtenidos por medio de SELEX son ácidos nucleicos que exhiben una alta afinidad por la sustancia diana, pero esto no significa la unión a un sitio activo de la sustancia diana. Por lo tanto, los aptámeros obtenidos por SELEX no actúan necesariamente sobre la función de la sustancia diana. El NGF es una proteína alcalina, y se piensa que es probable permitir que los ácidos nucleicos se unan inespecíficamente a la misma. Un aptámero que no se une a un sitio activo no influye en la actividad de la sustancia diana. De hecho, el ARN utilizado para el control no inhibía la unión de NGF y el receptor de NGF.

Basándose en un aptámero activo seleccionado de este modo, se puede realizar SELEX cambiando además un cebador para adquirir un aptámero que posea mayor actividad. Específicamente, después de preparar un molde en donde un aptámero con una secuencia determinada es parcialmente aleatorizado o un molde es dopado con aproximadamente 10 a 30% de secuencias aleatorias, SELEX se realiza de nuevo.

Un aptámero obtenido por medio de SELEX tiene una longitud de aproximadamente 80 nucleótidos, y esto es difícil de preparar como un producto farmacéutico tal cual. Por lo tanto, es necesario repetir los esfuerzos de prueba y error para acortar el aptámero a una longitud de aproximadamente 50 nucleótidos o menos que permita una síntesis química fácil. Dependiendo del diseño del cebador para un aptámero obtenido por medio de SELEX, la facilidad de una posterior operación de minimización cambia. A menos que el cebador se diseñe satisfactoriamente, el desarrollo posterior será imposible incluso si se selecciona un aptámero con actividad por medio de SELEX. En la presente invención, se obtuvo un aptámero que conservaba la actividad incluso con 38 nucleótidos.

Los aptámeros se modifican fácilmente ya que permiten la síntesis química. Para los aptámeros, mediante la predicción de la estructura secundaria utilizando el programa MFOLD, o mediante la predicción de la estructura estérica por medio de análisis de rayos X o análisis de RMN, es posible predecir en cierta medida qué nucleótido que puede ser sustituido o eliminado, y dónde insertar un nuevo nucleótido. Se puede sintetizar químicamente un aptámero pronosticado con la nueva secuencia, y se puede determinar si el aptámero conserva o no la actividad utilizando un sistema de análisis existente.

Si una región importante para la unión del aptámero obtenido con la molécula diana se identifica por medio de esfuerzos de prueba y error repetidos como se ha descrito anteriormente, la actividad se mantiene sin cambios en muchos casos incluso cuando se añade una nueva secuencia a ambos extremos de la secuencia. La longitud de la nueva secuencia no está particularmente limitada. En particular, las secuencias mencionadas anteriormente mostradas por UGAAAAAACY (SEQ ID NO: 110), UGAAAGAAACY (SEQ ID NO: 111), CGAACAAAAC (SEQ ID NO: 112) y CGAAAGAAAC (SEQ ID NO: 113) son partes importantes para la unión del aptámero de la presente invención a NGF y la inhibición de la unión de NGF al receptor de NGF. Incluso cuando se añade una nueva secuencia a ambos extremos de estas secuencias, la actividad se mantiene sin cambios en muchos casos.

Las modificaciones, como secuencias, permiten una amplia gama de diseños o alteraciones.

Como se indicó anteriormente, los aptámeros permiten una amplia gama de diseños o alteraciones de las modificaciones. La presente invención también proporciona un método de producción de aptámeros que permite una amplia gama de diseños o alteraciones de un aptámero que comprende una secuencia especificada (p. ej., una secuencia correspondiente a una porción seleccionada entre las regiones del tallo, las regiones de bucle interno, las regiones de bucle en horquilla y las regiones de hebra sencilla: en adelante, abreviadas como secuencia fija según sea necesario).

Por ejemplo, el método de producción de semejante aptámero incluye la producción de un aptámero que comprende una secuencia fija utilizando una sola clase de molécula de ácido nucleico que consiste en una secuencia de

nucleótidos mostrada por:

Secuencia de cebador (i) - (N) a - **secuencia fija** - (N) b - **Secuencia de cebador**

(ii)

[en donde (N)a representa una cadena de nucleótidos que consiste en "a" unidades de N; (N)b representa una cadena de nucleótidos de "b" unidades de N; cada una de las unidades de N, ya sea idéntica o diferente, es un nucleótido seleccionado del grupo que consiste en A, G, C, U y T (preferiblemente, A, G, C y U). Cada uno de "a" y "b", ya sean idénticos o diferentes, puede ser cualquier número, y puede ser, por ejemplo, de 1 a aproximadamente 100, preferiblemente de 1 a aproximadamente 50, más preferiblemente de 1 a aproximadamente 30, aún más preferiblemente de 1 a aproximadamente 20 o de 1 a aproximadamente 10], o clases plurales de moléculas de ácido nucleico (p. ej., una biblioteca de moléculas de ácido nucleico diferentes en número de a, b etc.) y pares de cebadores correspondientes a las secuencias de los cebadores (i) y (ii), respectivamente.

La presente memoria descriptiva también proporciona un complejo que comprende el aptámero de la presente invención y una sustancia funcional unida al mismo. El enlace entre el aptámero y la sustancia funcional en el complejo puede ser un enlace covalente o un enlace no covalente. El complejo puede ser uno en donde el aptámero de la presente invención y una o más (p. ej., 2 ó 3) de las sustancias funcionales de la misma clase o de diferentes clases están unidos entre sí. La sustancia funcional no está particularmente limitada, en la medida en que confiera nuevamente una cierta función a un aptámero de la presente invención, o sea capaz de cambiar (p. ej., mejorar) una cierta característica que pueda poseer un aptámero de la presente invención. Como ejemplos de la sustancia funcional, se pueden mencionar proteínas, péptidos, aminoácidos, lípidos, azúcares, monosacáridos, polinucleótidos, y nucleótidos. Como ejemplos de la sustancia funcional, se pueden mencionar sustancias de afinidad (p. ej., biotina, estreptavidina, polinucleótidos que poseen afinidad por la secuencia diana complementaria, anticuerpos, glutatión S-transferasa, histidina), sustancias para el marcaje (p. ej., sustancias fluorescentes, sustancias luminiscentes, radioisótopos), enzimas (p. ej., peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina), vehículos de liberación de fármacos (p. ej., liposomas, microesferas, péptidos, polietilenglicoles), fármacos (p. ej., los utilizados en la terapia con misiles tales como caliqueamicina y duocarmicina; análogos de mostaza nitrogenada tales como ciclofosfamida, melfalán, ifosfamida o trofosfamida; etileniminas tales como tiotepa; nitrosoureas tales como carmustina; agentes alquilantes tales como temozolomida o dacarbazina; antagonistas metabólicos de tipo folato tales como metotrexato o raltitrexed; análogos de purina tales como tioguanina, cladribina o fludarabina; análogos de pirimidina tales como fluorouracilo, tegafur o gemcitabina; alcaloides de vinca tales como vinblastina, vincristina o vinorelbina y análogos de los mismos; derivados de podofilotoxina tales como etopósido, taxanos, docetaxel o paclitaxel; antraciclinas tales como doxorubicina, epirubicina, idarrubicina y mitoxantrona, y análogos de los mismos; otros antibióticos citotóxicos, tales como bleomicina y mitomicina; compuestos de platino tales como cisplatino, carboplatino y oxaliplatino; pentostatina, miltefosina, estramustina, topotecán, irinotecán y bicalutamida), y toxinas (p. ej., toxina ricina, liatoxina y toxina Vero). Estas moléculas funcionales se eliminan finalmente en algunos casos. Además, las moléculas pueden ser péptidos que pueden ser reconocidos y escindidos por enzimas tales como trombina, metaloproteinasa de la matriz (MMP), y Factor X, y pueden ser polinucleótidos que pueden ser escindidos por nucleasas o endonucleasa de restricción.

El aptámero de la presente invención o el complejo se pueden utilizar, por ejemplo, como un medicamento o un agente de diagnóstico, un fármaco de ensayo, un reactivo, un aditivo para el agua potable y la comida, un potenciador y un mitigador.

El aptámero de la presente invención y el complejo pueden tener una actividad inhibidora de la función de NGF mediante la unión a NGF y la inhibición de la unión de NGF y el receptor de NGF. Como se mencionó anteriormente, el NGF está profundamente involucrado en el dolor y la inflamación. Por lo tanto, el aptámero de la presente invención y el complejo son útiles como medicamentos para el tratamiento o la profilaxis de enfermedades que están acompañadas de dolor o inflamación (agente anti-doloroso, agente anti-inflamatorio etc.).

Aquí, los ejemplos del dolor incluyen dolor nociceptivo (dolor muscular, dolor de espalda, dolor en las extremidades superiores, latigazo cervical, artralgia, osteoartritis, gota, artritis reumatoide crónica, dolor de cabeza, migraña, dolor de cabeza catatónico, cefalea en racimos, dolor de cabeza secundario, dolor orofacial, dolor de muelas, causalgia después de la extracción de dientes, dolor fantasma de dientes, dolor visceral, dolor cardíaco, dolor abdominal, dolor abdominal durante la ovulación, dismenorrea, dolor de parto, nefralgia, ureteralgia, ostalgia y similares), dolor inflamatorio, dolor neuropático (neuropatía diabética, neuropatía tóxica, dolor después de operación, dolor del miembro fantasma, dolor fragmentado, distrofia simpático refleja, causalgia, dolor post-herpético, neuralgia del trigémino, dolor central), dolor carcinomatoso (dolor debido a la infiltración del cáncer en órganos viscerales, dolor causado por la obstrucción de los vasos sanguíneos debido a infiltración de los vasos sanguíneos del tejido con cáncer, dolor de las metástasis óseas, dolor asociado con metástasis intracerebral, dolor causado por la infiltración del nervio periférico del tejido con cáncer), dolor de la fibromialgia y similares.

Si bien la enfermedad asociada con la inflamación aquí no está particularmente limitada, se pueden mencionar el lupus eritematoso generalizado, la esclerosis múltiple, la psoriasis, la osteoartritis, la artritis reumatoide crónica, la

cistitis intersticial, el asma y similares.

Si bien el cáncer mencionado anteriormente no está particularmente limitado, se pueden mencionar cáncer de esófago, cáncer de tiroides, cáncer de vejiga urinaria, cáncer colorrectal, cáncer gástrico, cáncer pancreático, cáncer torácico, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de mama, neuroblastoma, neuroblastoma, glioblastoma, cáncer de útero, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario, tumor de Wilms, cáncer de próstata y similares.

Cuando EL NGF se une a un receptor del mismo, TrkA, éste activa la fosforilación de tirosina de TrkA y Ras-MAPK, PLC- γ , PI3K y similares, aguas abajo de TrkA, y muestra acciones fisiológicas tales como la supervivencia y la diferenciación de las células nerviosas. Por otra parte, induce la muerte celular en la ruta de señalización a través del receptor p75. Por lo tanto, el aptámero y el complejo de la presente invención pueden utilizarse como medicamentos, agentes de diagnóstico, fármacos de ensayo, o reactivos para enfermedades relacionadas con la activación de estas vías de transducción de señal. Los ejemplos de las enfermedades relacionadas con la activación de estas rutas de transducción de señal incluyen los dolores y los cánceres mencionados anteriormente.

Cuando el aptámero de la presente invención y el complejo se usan como medicamentos, agentes de diagnóstico, fármacos de ensayo, reactivos y similares, el sujeto de la administración del aptámero no está particularmente limitado y se pueden mencionar, por ejemplo, primates (p. ej., ser humano, mono), roedores (p. ej., ratón, rata, cobaya), y animales de compañía, animales domésticos y animales de trabajo (p. ej., perro, gato, caballo, bóvidos, caprinos, óvidos, suidos).

El aptámero de la presente invención y el complejo son capaces de unirse específicamente al NGF. Por lo tanto, el aptámero de la presente invención y el complejo son útiles como sondas para la detección de NGF. Las sondas son útiles en la formación de imágenes in vivo de NGF, en las mediciones de las concentraciones en sangre, en la tinción de tejidos, el ELISA y similares. Las sondas también son útiles como agentes de diagnóstico, fármacos de ensayo, reactivos y similares para enfermedades en las que está implicado el NGF (enfermedades acompañadas de dolor o inflamación, y similares).

Basándose en su unión específica a NGF, el aptámero de la presente invención y el complejo se pueden utilizar como ligandos para la purificación de NGF.

Además, el aptámero de la presente invención y el complejo se pueden utilizar como fármacos de ensayo para examinar el estado mental de romance y similares, o medicamentos, reguladores, potenciadores o mitigadores para el control del estado mental.

El aptámero de la presente invención y el complejo se pueden utilizar como vehículos de liberación de fármacos.

El fármaco de la presente invención puede ser uno formulado con un portador farmacéuticamente aceptable. Como ejemplos del portador farmacéuticamente aceptable, se pueden mencionar excipientes tales como sacarosa, almidón, manitol, sorbitol, lactosa, glucosa, celulosa, talco, fosfato de calcio y carbonato de calcio; aglutinantes tales como celulosa, metilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, polipropilpirrolidona, gelatina, goma arábiga, polietilenglicol, sacarosa y almidón; disgregantes tales como almidón, carboximetilcelulosa, hidroxipropilalmidón, sodio-glicol-almidón, hidrogenocarbonato de sodio, fosfato de calcio, y citrato de calcio; lubricantes tales como estearato de magnesio, Aerosil, talco, y lauril sulfato de sodio; agentes aromatizantes tales como ácido cítrico, mentol, sal de amonio de glicirricina, glicina, y polvo de naranja; conservantes tales como benzoato de sodio, hidrogenosulfito de sodio, metilparabeno, y propilparabeno; estabilizantes tales como ácido cítrico, citrato de sodio, y ácido acético; agentes de suspensión tales como metilcelulosa, polivinilpirrolidona, y estearato de aluminio; agentes dispersantes tales como tensioactivos; diluyentes tales como agua, solución salina fisiológica, y zumo de naranja; ceras base tales como manteca de cacao, polietilenglicol, y queroseno; y similares, pero estos no son limitantes.

Las preparaciones adecuadas para la administración oral son una disolución preparada disolviendo una cantidad eficaz de ligando en un diluyente tal como agua, solución salina fisiológica, o zumo o de naranja; cápsulas, sobres o comprimidos que comprenden una cantidad eficaz de ligando en forma sólida o granular; una suspensión preparada suspendiendo una cantidad eficaz de ingrediente activo en un dispersante apropiado; una emulsión preparada dispersando y emulsionando una disolución de una cantidad eficaz de ingrediente activo en un dispersante apropiado, y similares.

El fármaco de la presente invención se puede recubrir mediante un método conocido per se con el fin de enmascarar el sabor, para la disolución entérica, para liberación sostenida y similares. Como ejemplos de agentes de recubrimiento utilizados para el recubrimiento, se emplean hidroxipropilmetilcelulosa, etilcelulosa, hidroximetilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, polioxietilenglicol, Tween 80, Pluronic F68, ftalato acetato de celulosa, ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa, acetato succinato de hidroximetilcelulosa, Eudragit (fabricado por Rohm, Alemania, copolímero de ácido metacrílico/ácido acrílico), pigmentos (p. ej., óxido férrico rojo, dióxido de titanio y similares) y similares. El fármaco puede ser una preparación de liberación rápida o una preparación de liberación sostenida. Los ejemplos de las bases de liberación sostenida incluyen liposomas, atelocolágeno, gelatina, hidroxiapatita, PLGA y similares.

En cuanto a las preparaciones adecuadas para la administración parenteral (p. ej., administración intravenosa, administración subcutánea, administración intramuscular, administración tópica, administración intraperitoneal, administración intranasal, administración pulmonar y similares), se encuentran disponibles fluidos inyectables estériles isotónicos acuosos y no acuosos, que pueden comprender un antioxidante, una disolución tampón, un agente bacteriostático, un agente de isotonicidad y similares. También se pueden mencionar las suspensiones estériles acuosas o no acuosas, que pueden comprender un agente suspensor, un solubilizante, un espesante, un estabilizador, un antiséptico y similares. La preparación puede estar incluida en un recipiente tal como una ampolla o un vial en un volumen de dosificación unitaria o en varias dosis divididas. Un ingrediente activo y un vehículo farmacéuticamente aceptable también se pueden liofilizar y almacenar en un estado que pueda ser disuelto o suspendido en un vehículo estéril adecuado justo antes del uso. Las preparaciones de liberación sostenida también son preparaciones adecuadas. Las preparaciones de liberación sostenida incluyen la liberación sostenida desde portadores o recipientes incluidos en el organismo, tales como huesos artificiales, esponjas biodegradables o no degradables, bolsas, bombas de infusión, bombas de presión osmótica y similares. Los dispositivos de liberación continua o intermitente, sistémica o tópica desde fuera del cuerpo también están incluidos en el alcance las preparaciones de liberación sostenida. Las bases biodegradables incluyen liposomas, liposomas catiónicos, poliácido (láctico-co-glicólico) (PLGA), aterocolágeno, gelatina, hidroxipatita, polisacárido sizofirano. Además de las inyecciones líquidas y de la preparación de liberación sostenida, también son aceptables los inhaladores y los ungüentos. En el caso de un inhalador, un ingrediente activo en un estado liofilizado se microniza y se administra por inhalación usando un dispositivo de inhalación apropiado. Un inhalador puede ser formulado según sea apropiado con un agente tensioactivo utilizado convencionalmente, aceite, condimentos, ciclodextrina o derivados de los mismos y similares según sea necesario.

Aquí, como ejemplos de agente tensioactivo, se pueden mencionar ácido oleico, lecitina, dioleato de dietilenglicol, oleato de tetrahidrofurfurilo, oleato de etilo, miristato de isopropilo, trioleato de glicerilo, monolaurato de glicerilo, monooleato de glicerilo, monoestearato de glicerilo, monolisinoato de glicerilo, alcohol cetílico, alcohol estearílico, polietilenglicol 400, cloruro de cetilpiridinio, trioleato de sorbitán (nombre comercial, Span 85), monooleato de sorbitán (nombre comercial, Span 80), monolaurato de sorbitán (nombre comercial, Span 20), aceite de ricino endurecido con polioxietileno (nombre comercial, HCO-60), monolaurato de polioxietileno sorbitán (20) (nombre comercial, Tween 20), monooleato de polioxietileno sorbitán (20) (nombre comercial, Tween 80), lecitina de origen natural (nombre comercial, EPICLON), éter oleílico de polioxietileno (2) (nombre comercial, Brij 92), éter estearílico de polioxietileno (2) (nombre comercial, Brij 72), éter alurílico de polioxietileno (4) (nombre comercial, Brij 30), (2) éter oleílico de polioxietileno (nombre comercial, Genapol 0-020), copolímero en bloque de oxietileno y oxipropileno (nombre comercial, Synperonic) y similares. Como ejemplos del aceite, se pueden mencionar aceite de maíz, aceite de oliva, aceite de semilla de algodón, aceite de girasol y similares. En el caso de una pomada, se combina una base farmacéuticamente aceptable apropiada (petrolato amarillo, petrolato blanco, parafina, plastibase, silicona, pomada blanca, cera de abeja, manteca de cerdo, aceites vegetales, pomada hidrófila, petrolato hidrófilo, lanolina purificada, lanolina hidrolizada, pomada absorbente de agua, plastibase hidrófila, pomada de macrogol y similares) con un ingrediente activo, y se utiliza como una preparación.

Se puede producir un inhalador de acuerdo con un método convencional. Específicamente, se puede producir un inhalador pulverizando o licuando el aptámero y el complejo de la presente invención descritos anteriormente, combinándolos en un propelente de inhalación y/o portador, y cargándolos en un recipiente de inhalación apropiado. Cuando el aptámero y el complejo de la presente invención descritos anteriormente son un polvo, se puede utilizar un inhalador de polvo mecánico ordinario; en el caso de un líquido, se puede utilizar un inhalador tal como un nebulizador. Aquí, como propelente, se puede utilizar ampliamente uno conocido convencionalmente; se pueden mencionar los compuestos de la serie del clorofluorocarbono tales como clorofluorocarbono-11, clorofluorocarbono-12, clorofluorocarbono-21, clorofluorocarbono-22, clorofluorocarbono-113, clorofluorocarbono-114, clorofluorocarbono-123, clorofluorocarbono-142c, clorofluorocarbono-134a, clorofluorocarbono-227, clorofluorocarbono-C318, y 1,1,1,2-tetrafluoroetano, hidrocarburos tales como propano, isobutano, y n-butano, éteres tales como éter dietílico, gases comprimidos tales como gas nitrógeno y gas dióxido de carbono y similares.

La dosificación del fármaco de la presente invención varía dependiendo de la clase y de la actividad del ingrediente activo, de la gravedad de la enfermedad, de la especie animal que está siendo objeto de administración, de la tolerancia al fármaco del sujeto de la administración, del peso corporal, de la edad y similares, y de la dosis habitual, basándose en la cantidad de ingrediente activo por día para un adulto, puede ser de aproximadamente 0,0001 a aproximadamente 100 mg/kg, por ejemplo, de aproximadamente 0,0001 a aproximadamente 10 mg/kg, preferiblemente de aproximadamente 0,005 a aproximadamente 1 mg/kg.

La presente memoria descriptiva también proporciona un portador en fase sólida que tiene el aptámero y el complejo de la presente invención inmovilizados sobre el mismo. Como ejemplos del portador en fase sólida, se pueden mencionar un sustrato, una resina, una placa (p. ej., placa de múltiples pocillos), un filtro, un cartucho, una columna, y un material poroso. El sustrato puede ser uno utilizado en los chips de ADN, chips de proteínas y similares; por ejemplo, se pueden mencionar sustratos de níquel-PTFE (politetrafluoroetileno), sustratos de vidrio, sustratos de apatita, sustratos de silicio, sustratos de alúmina y similares, y sustratos preparados mediante el recubrimiento de estos sustratos con un polímero y similares. Como ejemplos de la resina, se pueden mencionar partículas de agarosa, partículas de sílice, un copolímero de acrilamida y N,N'-metilenbisacrilamida, partículas de divinilbenceno entrecruzado con poliestireno, partículas de dextrano entrecruzado con epíclorhidrina, fibra de celulosa, polímeros

entrecruzados de arildextrano y N,N'- metilenbisacrilamida, polímeros sintéticos monodispersos, polímeros hidrófilos monodispersos, Sefarosa, Toyopearl y similares, y también se incluyen resinas preparadas mediante la unión de varios grupos funcionales a estas resinas. El portador en fase sólida de la presente invención puede ser útil, por ejemplo, en la purificación, detección y cuantificación de NGF.

El aptámero de la presente invención y el complejo pueden ser inmovilizados sobre un portador en fase sólida mediante un método conocido per se. Por ejemplo, se puede mencionar un método que introduce una sustancia de afinidad (p. ej., las descritas anteriormente) o un grupo funcional predeterminado en el aptámero o el complejo de la presente invención, y a continuación inmoviliza el aptámero y el complejo sobre un portador en fase sólida a través de la sustancia de afinidad o grupo funcional predeterminado. La presente memoria descriptiva también proporciona tales métodos. El grupo funcional predeterminado puede ser un grupo funcional que puede ser sometido a una reacción de acoplamiento; por ejemplo, se pueden mencionar un grupo amino, un grupo tiol, un grupo hidroxilo, y un grupo carboxilo. La presente invención también proporciona un aptámero que tiene semejante grupo funcional introducido en el mismo.

La presente memoria descriptiva también proporciona un método para purificar y concentrar el NGF. En particular, la presente memoria descriptiva hace que sea posible separar el NGF de las proteínas de otras proteínas de la familia. El método de purificación y concentración puede comprender la adsorción de NGF en el portador en fase sólida de la presente invención, y la elución del NGF adsorbido con un eluyente. Adsorción de NGF en el portador en fase sólida de la presente invención se puede conseguir por medio de un método conocido per se. Por ejemplo, una muestra que contiene NGF (p. ej., un cultivo bacteriano o celular o un sobrenadante de cultivo, sangre) se introduce en el portador en fase sólida de la presente invención o una composición que lo contiene. El NGF se puede hacer eluir utilizando un eluyente tal como una disolución neutra. No existe ninguna limitación sobre el eluyente neutro, que puede tener un pH, por ejemplo, de aproximadamente 6 a aproximadamente 9, preferiblemente de aproximadamente 6,5 a aproximadamente 8,5, y más preferiblemente de aproximadamente 7 a aproximadamente 8. La disolución neutra también puede comprender, por ejemplo, urea, un agente quelante (por ejemplo, EDTA), una sal de potasio (por ejemplo, KCl), una sal de magnesio (p. ej., $MgCl_2$), un agente tensioactivo (por ejemplo, Tween 20, Triton, NP40), y glicerina. El método de purificación y concentración puede comprender además el lavado del portador en fase sólida utilizando una disolución de lavado después de la adsorción del NGF. Los ejemplos de la disolución de lavado incluyen aquellas que contienen urea, un agente quelante (p. ej., EDTA), Tris, un ácido, un álcali, ARN de transferencia, ADN, tensioactivos tales como Tween 20, sales tales como NaCl y similares. El método de purificación y concentración todavía puede comprender además el calentamiento del portador en fase sólida. Esta etapa permite la regeneración y la esterilización del portador en fase sólida.

La presente memoria descriptiva también proporciona un método de detección y cuantificación de NGF. En particular, la presente memoria descriptiva hace posible detectar y cuantificar el NGF por separado de las proteínas de otras proteínas de la familia. El método de detección y cuantificación puede comprender la medición de NGF mediante la utilización del aptámero de la presente invención (p. ej., por medio del uso del complejo y el portador en fase sólida de la presente invención). El método de detección y cuantificación de NGF se puede realizar de la misma manera que un método inmunológico, excepto que se utiliza el aptámero de la presente invención en lugar de un anticuerpo. Por lo tanto, mediante el uso del aptámero de la presente invención como una sonda en lugar de un anticuerpo, de la misma manera que métodos tales como el inmunoanálisis enzimático (EIA) (p. ej., ELISA competitivo directo, ELISA competitivo indirecto, ELISA sándwich), el radioinmunoanálisis (RIA), inmunoanálisis fluorescente (FIA), la técnica de transferencia Western, el método de tinción inmunohistoquímica, y el método de clasificación de células, se pueden llevar a cabo la detección y la cuantificación. El aptámero de la presente invención también se puede utilizar como una sonda molecular para PET y similares. Estos métodos pueden ser útiles, por ejemplo, para medir el contenido de NGF en organismos vivos o muestras biológicas, y en el diagnóstico de una enfermedad asociada con el NGF.

Ejemplos

La presente invención se describe a continuación con más detalle por medio de los siguientes Ejemplos, que, sin embargo, nunca limitan el alcance de la invención.

Ejemplo 1: Preparación de aptámeros de ARN que se unen específicamente a NGF 1

Los aptámeros de ARN que se unen específicamente al NGF se prepararon utilizando el método SELEX. El SELEX se realizó mediante la referencia al método de Ellington et al. (Ellington y Szostak, Nature 346, 818-822, 1990) y el método de Tuerk et al. (Tuerk y Gold, Science 249, 505-510, 1990). El NGF humano (fabricado por R & D Systems) se utilizó como una sustancia diana. El ARN utilizado en la cebadora ronda (ARN 40N) se obtuvo mediante la transcripción de un ADN sintetizado químicamente utilizando DuraScribe™ T7 Transcription Kit (fabricado por Epicentre). El ARN obtenido por este método tiene la posición 2' de la ribosa del nucleótido de pirimidina remplazado por flúor. Se utilizó el ADN de 79 nucleótidos de largo mostrado más abajo, que tiene una secuencia de cebador en cada extremo de una secuencia al azar de 40 nucleótidos como molde de ADN. El molde de ADN y los cebadores se prepararon por síntesis química.

Molde de ADN: 5'-ccagttgttggtgacaatgc-40N-gcagctccacaggcttccc-
3' (SEQ ID NO: 114)

Cebador Directo: 5'-taatacgactcactataggaagcctgtggagctgc-3' (SEQ ID NO: 115)

Cebador Inverso: 5'-ccagttgttggtgacaatgc-3' (SEQ ID NO: 116)

- 5 N representa una cualquiera de A, G, C y T. El cebador Directo comprende una secuencia promotora de ARN polimerasa de T7. La variación de la reserva de ARN utilizada en la cebadora ronda fue teóricamente 10^{14} .

Después de 10 rondas de SELEX, las secuencias se secuenciaron; se observó la convergencia de las secuencias. En 48 clones, estuvieron presentes 6 secuencias mostradas por el SEQ ID NO: 1, y 5 secuencias mostradas por el SEQ ID NO: 2. Estuvieron presentes 3 secuencias mostradas por los SEQ ID NO: 3 - 5, y dos secuencias mostradas por los SEQ ID NO: 6 - 8. Solamente una secuencia estuvo mostrada por los SEQ ID NO: 9 - 23. Muchas secuencias
10 contenían una secuencia consenso UGAAAAAACC (SEQ ID NO: 91). Las estructuras secundarias de estas secuencias fueron pronosticadas utilizando el programa MFOLD (M. Zuker, Nucleic Acids Res. 31(13), 3406-3415, 2003) y se pronosticaron estructuras en joroba que tenían porciones de secuencias consenso similares. Las supuestas estructuras secundarias de los aptámeros de las secuencias mostradas por los SEQ ID NO: 1-9 y 12 se proporcionan en las Figs. 1-10, en donde las secuencias consenso están incluidas en un círculo.

- 15 Las secuencias de nucleótidos obtenidas en realidad, que corresponden a cada SEQ ID NO, se muestran más abajo. Los paréntesis de cada nucleótido muestran modificaciones en la posición 2' y F es un átomo de flúor (en adelante lo mismo).

SEQ ID NO: 1:

gggaagc (F) c (F) u (F) gu (F) ggagc (F) u (F) gc (F) aggau (F) gaaaaaac (F) c (F) c (F) aaaaac (F) aaagac (F) aaau (F) gau (F) u (F) gagu (F) agc (F) au (F) u (F) gu (F) c (F) ac (F) c (F) aac (F) aac (F) u (F) gg

- 20 SEQ ID NO: 2:

gggaagc (F) c (F) u (F) gu (F) ggagc (F) u (F) gc (F) c (F) u (F) ac (F) ac (F) u (F) u (F) u (F) agu (F) au (F) gac (F) aaac (F) c (F) u (F) agagu (F) gu (F) aaau (F) gc (F) u (F) u (F) c (F) gc (F) au (F) u (F) gu (F) c (F) ac (F) c (F) aac (F) aac (F) u (F)) gg

SEQ ID NO: 3:

gggaagc (F) c (F) u (F) gu (F) ggagc (F) u (F) gc (F) aggau (F) gaaaaaac (F) c (F) c (F) aaaaau (F) aagu (F) agaaaau (F) gac (F) agaaau (F) ggc (F) au (F) u (F) gu (F) c (F) ac (F) c (F) aac (F) aac (F) u (F) gg

SEQ ID NO: 4:

gggaagc (F) c (F) u (F) gu (F) ggagc (F) u (F) gc (F) aggau (F) gaaaaaac (F) c (F) c (F) aaau (F) au (F) gac (F) aaau (F) aaaac (F) ggc (F) aac (F) gc (F) au (F) u (F) gu (F) c (F) ac (F) c (F) aac (F) aac (F) u (F) gg

- 25 SEQ ID NO: 5:

gggaagc (F) c (F) u (F) gu (F) ggagc (F) u (F) gc (F) u (F) u (F) aaac (F) aagc (F) aagu (F) gaaaaaac (F) c (F) ac (F) agc (F) aaau (F) gu (F) aaaaagc (F) au (F) u (F) gu (F) c (F) ac (F) c (F) aac (F) aac (F) u (F) gg

SEQ ID NO: 6:

gggaagc (F) c (F) u (F) gu (F) ggagc (F) u (F) gc (F) aggau (F) gaaaaaaac (F) c (F) c (F) aaaau (F) u (F) aaau (F) aaaaaau (F) agac (F) ggu (F) gc (F) au (F) u (F) gu (F) c (F) ac (F) c (F) aac (F) aac (F) u (F) gg

SEQ ID NO: 7:

gggaagc (F) c (F) u (F) gu (F) ggagc (F) u (F) gc (F) aggau (F) gaaaaaaac (F) c (F) c (F) aaaau (F) u (F) agau (F) aaaaaau (F) agac (F) ggu (F) gc (F) au (F) u (F) gu (F) c (F) ac (F) c (F) aac (F) aac (F) u (F) gg

5 SEQ ID NO: 8:

gggaagc (F) c (F) u (F) gu (F) ggagc (F) u (F) gc (F) ggau (F) aaaaau (F) agagu (F) u (F) u (F) gau (F) aaac (F) ac (F) c (F) u (F) gu (F) au (F) u (F) aaaac (F) c (F) gc (F) au (F) u (F) gu (F) c (F) ac (F) c (F) aac (F) aac (F) u (F) gg

SEQ ID NO: 9:

gggaagc (F) c (F) u (F) gu (F) ggagc (F) u (F) gc (F) u (F) c (F) c (F) ac (F) aagga u (F) gaaaaaaac (F) c (F) c (F) aaau (F) aaau (F) au (F) au (F) u (F) u (F) aaau (F) c (F) agc (F) au (F) u (F) gu (F) c (F) ac (F) c (F) aac (F) aac (F) u (F) gg

SEQ ID NO: 10:

10 gggaagc (F) c (F) u (F) gu (F) ggagc (F) u (F) gc (F) aggau (F) gaaaaaaac (F) c (F) c (F) aaau (F) u (F) aaagagc (F) u (F) u (F) gac (F) aaaac (F) au (F) gc (F) au (F) u (F) gu (F) c (F) ac (F) c (F) aac (F) aac (F) u (F) gg

SEQ ID NO: 11:

gggaagc (F) c (F) u (F) gu (F) ggagc (F) u (F) gc (F) u (F) c (F) c (F) ac (F) aagga u (F) gaaaaaaac (F) c (F) c (F) aaau (F) aaau (F) au (F) au (F) u (F) u (F) aaau (F) c (F) agc (F) au (F) u (F) gu (F) c (F) ac (F) c (F) aac (F) aac (F) u (F) gg

SEQ ID NO: 12:

gggaagc (F) c (F) u (F) gu (F) ggagc (F) u (F) gc (F) gaaac (F) agu (F) gaaac (F) aaac (F) c (F) ac (F) agac (F) u (F) gagaaagc (F) agu (F) aac (F) agc (F) au (F) u (F) gu (F) c (F) ac (F) c (F) aac (F) aac (F) u (F) gg

15 SEQ ID NO: 13:

gggaagc (F) c (F) u (F) gu (F) ggagc (F) u (F) gc (F) aggau (F) gaaaaaaac (F) c (F) c (F) aaaau (F) u (F) aaau (F) aaaaaaaaau (F) ggac (F) ggu (F) gc (F) au (F) u (F) gu (F) c (F) ac (F) c (F) aac (F) aac (F) u (F) gg

SEQ ID NO: 14:

gggaagc (F) c (F) u (F) gu (F) ggagc (F) u (F) gc (F) u (F) gaau (F) u (F) ggau (F)
ac (F) agau (F) agu (F) u (F) gaaaaaac (F) c (F) aaau (F) gau (F) c (F) agc (F) au
(F) u (F) gu (F) c (F) ac (F) c (F) aac (F) aac (F) u (F) gg

SEQ ID NO: 15:

gggaagc (F) c (F) u (F) gu (F) ggagc (F) u (F) gc (F) u (F) c (F) c (F) ac (F) aagga
u (F) gaaaaaac (F) c (F) c (F) c (F) aaau (F) aaau (F) au (F) au (F) u (F) u (F) gau (F) c
(F) agc (F) au (F) u (F) gu (F) c (F) ac (F) c (F) aac (F) aac (F) u (F) gg

SEQ ID NO: 16:

gggaagc (F) c (F) u (F) gu (F) ggagc (F) u (F) gc (F) u (F) c (F) c (F) ac (F) aagga
u (F) gaaaaaac (F) c (F) c (F) c (F) aaau (F) aaau (F) gu (F) au (F) u (F) u (F) aaau
(F) c (F) agc (F) au (F) u (F) gu (F) c (F) ac (F) c (F) aac (F) aac (F) u (F) gg

5

SEQ ID NO: 17:

gggaagc (F) c (F) u (F) gu (F) ggagc (F) u (F) gc (F) aggau (F) ggaaaaaac (F) c (F)
c (F) aaau (F) aagu (F) agaaau (F) gac (F) agaau (F) ggc (F) au (F) u (F) gu (F)
c (F) ac (F) c (F) aac (F) aac (F) u (F) gg

SEQ ID NO: 18:

gggaagc (F) c (F) u (F) gu (F) ggagc (F) u (F) gc (F) c (F) gaaau (F) ggac (F) u (F)
) gu (F) aaagc (F) au (F) gaaaaaac (F) c (F) au (F) u (F) c (F) aaau (F) c (F) gagg
c (F) au (F) u (F) gu (F) c (F) ac (F) c (F) aac (F) aac (F) u (F) gg

10 SEQ ID NO: 19:

gggaagc (F) c (F) u (F) gu (F) ggagc (F) u (F) gc (F) aggau (F) gaaaaaac (F) c (F)
) c (F) aaac (F) u (F) aaagu (F) u (F) u (F) aaaac (F) u (F) gau (F) ac (F) gagc (F)
) au (F) u (F) gu (F) c (F) ac (F) c (F) aac (F) aac (F) u (F) gg

SEQ ID NO: 20:

gggaagc (F) c (F) u (F) gu (F) ggagc (F) u (F) gc (F) aggau (F) gaaaaaac (F) c (F)
c (F) aaau (F) u (F) aaaaac (F) u (F) u (F) gc (F) c (F) gagc (F) au (F) u (F) gu (F)
c (F) ac (F) c (F) aac (F) aac (F) u (F) gg

SEQ ID NO: 21:

gggaagc (F) c (F) u (F) gu (F) ggagc (F) u (F) gc (F) aggau (F) gaaaaaac (F) c (F)
) c (F) aaaaac (F) aaagac (F) aac (F) gau (F) u (F) gagu (F) agc (F) au (F) u (F)
) gu (F) c (F) ac (F) c (F) aac (F) aac (F) u (F) gg

15

SEQ ID NO: 22:

gggaagc (F) c (F) u (F) gu (F) ggagc (F) u (F) gc (F) aggau (F) gaaaaaac (F) c (F)
c (F) aaau (F) u (F) gu (F) c (F) c (F) ac (F) agaaau (F) ggau (F) u (F) gc (F)
au (F) u (F) gu (F) c (F) ac (F) c (F) aac (F) aac (F) u (F) gg

SEQ ID NO: 23:

gggaagc (F) c (F) u (F) gu (F) ggagc (F) u (F) gc (F) gaaac (F) agu (F) gaaac (F)
 aaac (F) c (F) ac (F) agac (F) u (F) gagaaagc (F) agu (F) aaaagc (F) au (F) u (F)
 gu (F) c (F) ac (F) c (F) aac (F) aac (F) u (F) gg

Las actividades de unión a NGF de los ácidos nucleicos mostrados por los SEQ ID NO: 1-9 y 12 fueron evaluadas por el método de resonancia de plasmón superficial. Las mediciones fueron tomadas utilizando BIAcore 2000 (fabricado por BIAcore). Se utilizó el chip SA como chip sensor, que tenía estreptavidina inmovilizada sobre el mismo. Unidas al mismo había aproximadamente 1500 UR de un Poli dT de 16 nucleótidos con biotina unida al extremo 5' del mismo. El ácido nucleico del ligando tenía un Poli A de 16 nucleótidos añadido al extremo 3' del mismo, y se inmovilizó sobre el chip SA a través de un enlace entre T y A. La cantidad inmovilizada fue de aproximadamente 1000 UR. Se inyectaron 20 µl de NGF para el analito, preparado a 0,5 µM, con la adición de una concentración final de NaCl 0,3 M para disminuir la adsorción no específica. Se utilizó la disolución A como un tampón de migración. Aquí, la disolución A es una mezcla disolvente de cloruro de sodio 145 mM, cloruro de potasio 5,4 mM, cloruro de calcio 1,8 mM, cloruro de magnesio 0,8 mM, Tris 20 mM (pH 7,6), y Tween 20 al 0,05%. Como resultado de la medición, se encontró que todos los ácidos nucleicos mostrados por los SEQ ID NO: 1-9 y 12 se unían a NGF significativamente más que el control 40N. Aquí, 40N se refiere a la reserva de ácido nucleico utilizada para la cebadora ronda, que comprende una secuencia aleatoria de 40 nucleótidos. Como ejemplo, se muestra en la Fig. 11 un sensograma que muestra un estado de la unión del aptámero mostrado por el SEQ ID NO: 6 y el NGF. A partir de lo anterior, se ha demostrado que estos ácidos nucleicos son aptámeros que se unen a NGF.

Ejemplo 2: Preparación de aptámeros de ARN que se unen específicamente a NGF 2

Se realizó SELEX de la misma manera que en el Ejemplo 1 excepto que se utilizó un molde que tenía una secuencia aleatoria de 30 nucleótidos y secuencias de cebadores diferentes de los utilizados en el Ejemplo 1. El molde y las secuencias de los cebadores utilizados se muestran a continuación. En cuanto al molde, se utilizó una secuencia aleatoria de 30 nucleótidos. El molde de ADN y los cebadores fueron producidos por síntesis química.

molde de ADN: 5'-tgaggatccatgtatgcgcacata-30N-
 cttctggtcgaagttctccc-3' (SEQ ID NO: 117)

cebador Directo: 5'-cggaattctaatacgactcactatagggagaacttcgaccagaag-
 3' (SEQ ID NO: 118)

Cebador Inverso: 5'-tgaggatccatgtatgcgcacata-3' (SEQ ID NO: 119)

Después de 13 rondas de SELEX, se secuenciaron las secuencias. Aunque todavía no se había observado convergencia de las secuencias, muchas secuencias contenían una secuencia consenso de UGAAAAAAACC (SEQ ID NO: 91). Además, algunas secuencias contenían mutaciones en la secuencia consenso de UGAAAAAAACC (SEQ ID NO: 91) tales como UGAAAGAAACC (SEQ ID NO: 92), UGAAAGAACC (SEQ ID NO: 95), UGAAAGGAACC (SEQ ID NO: 105) y similares.

Si bien la secuencia primaria es algo diferente, AGAAUGAAACU (SEQ ID NO: 102) estuvo presente como secuencia que se esperaba que tuviera una estructura de joroba similar por el programa MFOLD.

Un subgrupo de estas secuencias se muestra en los SEQ ID NO: 37 - 42.

Después de 16 rondas de SELEX, las secuencias se secuenciaron de nuevo. No se observó convergencia de otras secuencias pero estuvieron presentes dos secuencias mostradas por los SEQ ID NO: 43 y 51. Muchas de estas secuencias contenían, como las secuencias después de 13 rondas, la secuencia consenso de UGAAAAAAACC (SEQ ID NO: 91). Además, algunas secuencias contenían mutaciones en la secuencia consenso de UGAAAAAAACC (SEQ ID NO: 91) tales como UGAAAGAAACC (SEQ ID NO: 92), UGAAACAAACC (SEQ ID NO: 94), UGAAAGAACC (SEQ ID NO: 95), UGAAAGGAACC (SEQ ID NO: 105), UGAAAAAACC (SEQ ID NO: 97), y similares.

Un subgrupo de estas secuencias se muestra en los SEQ ID NO: 43 - 53.

Después de 19 rondas de SELEX, las secuencias se secuenciaron de nuevo. Aunque estuvieron presentes 3 secuencias mostradas por el SEQ ID NO: 56 y 2 secuencias mostradas por cada uno de los SEQ ID NO: 54, 57 y 67, todavía no se observó convergencia de otras secuencias. Muchas de estas secuencias contenían una secuencia consenso tal como UGAAAAAAACC (SEQ ID NO: 91), UGAAAGAAACC (SEQ ID NO: 92) y UGAAAGAACC (SEQ ID NO: 95).

Un subgrupo de estas secuencias se muestra en los SEQ ID NO: 54 - 59.

Después de 22 rondas de SELEX, las secuencias se secuenciaron de nuevo. Estuvieron presentes 6 secuencias mostradas por el SEQ ID NO: 67 y 3 secuencias mostradas por el SEQ ID NO: 68. Estas secuencias contenían secuencias de CGAACAAAACU (SEQ ID NO: 103) y CGAAAGAAACU (SEQ ID NO: 104) similares a la secuencia consenso mostrada por el SEQ ID NO: 91. No se observaron convergencias de otras secuencias, pero muchas secuencias contenían las secuencias consenso de UGAAAAAACCC (SEQ ID NO: 91) y UGAAAGAAACC (SEQ ID NO: 92).

Un subgrupo de estas secuencias se muestra en los SEQ ID NO: 60 - 68.

Las secuencias de nucleótidos obtenidas en realidad que correspondían a los SEQ ID NO mencionados anteriormente se muestran a continuación. Los paréntesis en los nucleótidos muestran la modificación en la posición 2' y F es un átomo de flúor.

SEQ ID NO: 37:

gggagaac (F) u (F) u (F) c (F) gac (F) c (F) agaagu (F) u (F) u (F) gaaagaaac (F)
c (F) c (F) aaaggu (F) gaaac (F) aac (F) aaau (F) au (F) gu (F) gc (F) gc (F) au (F)
ac (F) au (F) ggau (F) c (F) c (F) u (F) c (F) a

SEQ ID NO: 38:

gggagaac (F) u (F) u (F) c (F) gac (F) c (F) agaagagaau (F) gaaac (F) u (F) c (F)
c (F) ac (F) aaagu (F) ac (F) au (F) aaaac (F) au (F) au (F) gu (F) gc (F) gc (F) au
(F) ac (F) au (F) ggau (F) c (F) c (F) u (F) c (F) a

SEQ ID NO: 39:

gggagaac (F) u (F) u (F) c (F) gac (F) c (F) agaagu (F) gu (F) gaaaagaac (F) c (F)
) c (F) aaau (F) aaaac (F) aac (F) aaau (F) gu (F) au (F) gu (F) gc (F) gc (F) au (F)
ac (F) au (F) ggau (F) c (F) c (F) u (F) c (F) a

SEQ ID NO: 40:

gggagaac (F) u (F) u (F) c (F) gac (F) c (F) agaagu (F) u (F) u (F) gaaaaaaac (F)
c (F) c (F) aggaaaau (F) ggaagac (F) gu (F) au (F) gu (F) gc (F) gc (F) au (F) ac (F)
F) au (F) ggau (F) c (F) c (F) u (F) c (F) a

SEQ ID NO: 41:

gggagaac (F) u (F) u (F) c (F) gac (F) c (F) agaagu (F) u (F) u (F) gaaaggaac (F)
c (F) c (F) aaagc (F) gaaac (F) aaaac (F) gu (F) au (F) gu (F) gc (F) gc (F) au (F)
ac (F) au (F) ggau (F) c (F) c (F) u (F) c (F) a

SEQ ID NO: 42:

gggagaac (F) u (F) u (F) c (F) gac (F) c (F) agaagu (F) u (F) u (F) gaaaaaaac (F)
c (F) c (F) aaaagagc (F) agc (F) agagau (F) au (F) gu (F) gc (F) gc (F) au (F) ac (F)
F) au (F) ggau (F) c (F) c (F) u (F) c (F) a

SEQ ID NO: 43:

gggagaac (F) u (F) u (F) c (F) gac (F) c (F) agaagc (F) u (F) u (F) gaaaaaac (F) c
(F) c (F) c (F) aaau (F) au (F) gagaau (F) c (F) au (F) au (F) au (F) gu (F) gc (F) gc
(F) au (F) ac (F) au (F) ggau (F) c (F) c (F) u (F) c (F) a

SEQ ID NO: 44:

gggagaac (F) u (F) u (F) c (F) gac (F) c (F) agaagu (F) u (F) u (F) gaaagaaac (F)
c (F) c (F) aaaau (F) u (F) agc (F) ac (F) c (F) au (F) aaau (F) au (F) gu (F) gc (F) g
c (F) au (F) ac (F) au (F) ggau (F) c (F) c (F) u (F) c (F) a

5 SEQ ID NO: 45:

gggagaac (F) u (F) u (F) c (F) gac (F) c (F) agaagagaau (F) gaaac (F) u (F) c (F)
c (F) c (F) aaau (F) c (F) aaggac (F) aaau (F) gau (F) au (F) gu (F) gc (F) gc (F) au
(F) ac (F) au (F) ggau (F) c (F) c (F) u (F) c (F) a

SEQ ID NO: 46:

gggagaac (F) u (F) u (F) c (F) gac (F) c (F) agaagu (F) u (F) u (F) gaaac (F) aaac
(F) c (F) c (F) aaagu (F) u (F) ac (F) gc (F) ac (F) aaaau (F) au (F) gu (F) gc (F) g
c (F) au (F) ac (F) au (F) ggau (F) c (F) c (F) u (F) c (F) a

SEQ ID NO: 47:

10 gggagaac (F) u (F) u (F) c (F) gac (F) c (F) agaagaagu (F) u (F) u (F) gaaaagaac
(F) c (F) c (F) aaaau (F) gagc (F) aaaau (F) au (F) gu (F) gc (F) gc (F) au (F) ac (F)
F) au (F) ggau (F) c (F) c (F) u (F) c (F) a

SEQ ID NO: 48:

gggagaac (F) u (F) u (F) c (F) gac (F) c (F) agaagu (F) u (F) u (F) gaaaagaac (F)
c (F) c (F) gaaaaaac (F) gc (F) au (F) aaau (F) aaau (F) au (F) gu (F) gc (F) gc (F) au
(F) ac (F) au (F) ggau (F) c (F) c (F) u (F) c (F) a

SEQ ID NO: 49:

15 gggagaac (F) u (F) u (F) c (F) gac (F) c (F) agaagu (F) gaaagaaac (F) u (F) c (F)
c (F) c (F) aagac (F) ggu (F) aac (F) gaaagu (F) au (F) gu (F) gc (F) gc (F) au (F)
ac (F) au (F) ggau (F) c (F) c (F) u (F) c (F) a

SEQ ID NO: 50:

gggagaac (F) u (F) u (F) c (F) gac (F) c (F) agaagu (F) gaaaaaac (F) c (F) u (F) c
(F) c (F) c (F) aaau (F) ac (F) aaac (F) ac (F) aaaau (F) au (F) gu (F) gc (F) gc (F)
) au (F) ac (F) au (F) ggau (F) c (F) c (F) u (F) c (F) a

SEQ ID NO: 51:

gggagaac (F) u (F) u (F) c (F) gac (F) c (F) agaagu (F) u (F) u (F) gaaagaaac (F)
c (F) c (F) aaaaaaac (F) aac (F) au (F) au (F) gaac (F) u (F) au (F) gu (F) gc (F) g
c (F) au (F) ac (F) au (F) ggau (F) c (F) c (F) u (F) c (F) a

SEQ ID NO: 52:

gggagaac (F) u (F) u (F) c (F) gac (F) c (F) agaagu (F) u (F) u (F) gaaagaaac (F)
c (F) c (F) aaau (F) au (F) ac (F) aaaac (F) ac (F) u (F) au (F) gu (F) gc (F) gc (F)
au (F) ac (F) au (F) ggau (F) c (F) c (F) u (F) c (F) a

5 SEQ ID NO: 53:

gggagaac (F) u (F) u (F) c (F) gac (F) c (F) agaagu (F) u (F) u (F) gaaaggaac (F)
c (F) c (F) aaaaac (F) ac (F) aaaau (F) gu (F) c (F) u (F) au (F) gu (F) gc (F) gc (F)
) au (F) ac (F) au (F) ggau (F) c (F) c (F) u (F) c (F) a

SEQ ID NO: 54:

gggagaac (F) u (F) u (F) c (F) gac (F) c (F) agaagu (F) c (F) gaaagu (F) gaaagaa
ac (F) u (F) c (F) c (F) aac (F) gaaagc (F) au (F) au (F) gu (F) gc (F) gc (F) au (F)
ac (F) au (F) ggau (F) c (F) c (F) u (F) c (F) a

SEQ ID NO: 55:

gggagaac (F) u (F) u (F) c (F) gac (F) c (F) agaagu (F) u (F) u (F) gaaagaaac (F)
c (F) c (F) aaaaau (F) gaau (F) gc (F) aac (F) u (F) au (F) gu (F) gc (F) gc (F) au (F)
F) ac (F) au (F) ggac (F) c (F) u (F) c (F) a

10

SEQ ID NO: 56:

gggagaac (F) u (F) u (F) c (F) gac (F) c (F) agaagu (F) gaaagaaac (F) u (F) c (F)
c (F) c (F) aac (F) ac (F) aaau (F) gc (F) ac (F) aac (F) u (F) au (F) gu (F) gc (F) g
c (F) au (F) ac (F) au (F) ggau (F) c (F) c (F) u (F) c (F) a

SEQ ID NO: 57:

gggagaac (F) u (F) u (F) c (F) gac (F) c (F) agaagu (F) u (F) u (F) gaaaaaac (F)
c (F) c (F) aaac (F) ac (F) c (F) gaagc (F) ac (F) aaau (F) au (F) gu (F) gc (F) gc (F)
F) au (F) ac (F) au (F) ggau (F) c (F) c (F) u (F) c (F) a

15 SEQ ID NO: 58:

gggagaac (F) u (F) u (F) c (F) gac (F) c (F) agaagu (F) u (F) u (F) gaaaagaac (F)
c (F) c (F) aaau (F) ac (F) agaau (F) aaau (F) gu (F) au (F) gu (F) gc (F) gc (F) au
(F) ac (F) au (F) ggau (F) c (F) c (F) u (F) c (F) a

SEQ ID NO: 59:

gggagaac (F) u (F) u (F) c (F) gac (F) c (F) agaagu (F) c (F) gaaac (F) gu (F) u (F)
) u (F) gaaaaaac (F) c (F) c (F) aaggaggau (F) au (F) gu (F) gc (F) gc (F) au (F)
ac (F) au (F) ggau (F) c (F) c (F) u (F) c (F) a

SEQ ID NO: 60:

gggagaac (F) u (F) u (F) c (F) gac (F) c (F) agaagau (F) u (F) u (F) gaaaaaac (F)
) c (F) c (F) gaau (F) aaagau (F) aac (F) agu (F) au (F) gu (F) gc (F) gc (F) au (F)
ac (F) au (F) ggau (F) c (F) c (F) u (F) c (F) a

5 SEQ ID NO: 61:

gggagaac (F) u (F) u (F) c (F) gac (F) c (F) agaaggu (F) c (F) gu (F) aac (F) gaau
(F) aaaac (F) u (F) c (F) c (F) u (F) gc (F) ac (F) aaaaau (F) au (F) gu (F) gc (F) g
c (F) au (F) ac (F) au (F) ggau (F) c (F) c (F) u (F) c (F) a

SEQ ID NO: 62:

gggagaac (F) u (F) u (F) c (F) gac (F) c (F) agaagu (F) u (F) u (F) gaaagaaac (F)
c (F) c (F) aaau (F) u (F) aaagu (F) gaac (F) agu (F) au (F) gu (F) gc (F) gc (F) au
(F) ac (F) au (F) ggau (F) c (F) c (F) u (F) c (F) a

SEQ ID NO: 63:

gggagaac (F) u (F) u (F) c (F) gac (F) c (F) agaagau (F) u (F) u (F) gaaagaaac (F)
) c (F) c (F) aaac (F) u (F) aagc (F) ac (F) aaaaau (F) au (F) gu (F) gc (F) gc (F) au
10 (F) ac (F) au (F) ggau (F) c (F) c (F) u (F) c (F) a

SEQ ID NO: 64:

gggagaac (F) u (F) u (F) c (F) gac (F) c (F) agaagu (F) u (F) u (F) gaaagaaac (F)
c (F) c (F) aaaac (F) au (F) u (F) agc (F) ac (F) ac (F) au (F) au (F) gu (F) gc (F) g
c (F) au (F) ac (F) au (F) ggau (F) c (F) c (F) u (F) c (F) a

SEQ ID NO: 65:

gggagaac (F) u (F) u (F) c (F) gac (F) c (F) agaagu (F) gu (F) gaaaaaac (F) c (F)
) c (F) aaau (F) c (F) gagc (F) ac (F) aaaaau (F) u (F) au (F) gu (F) gc (F) gc (F) au
(F) ac (F) au (F) ggau (F) c (F) c (F) u (F) c (F) a

15 SEQ ID NO: 66:

gggagaac (F) u (F) u (F) c (F) gac (F) c (F) agaagu (F) u (F) u (F) gaaaaaac (F)
c (F) c (F) aaagc (F) aagc (F) ac (F) aac (F) au (F) u (F) au (F) gu (F) gc (F) gc (F)
) au (F) ac (F) au (F) ggau (F) c (F) c (F) u (F) c (F) a

SEQ ID NO: 67:

gggagaac (F) u (F) u (F) c (F) gac (F) c (F) agaagu (F) c (F) gau (F) aac (F) gaac
(F) aaaac (F) u (F) c (F) c (F) c (F) aaaggaau (F) au (F) au (F) gu (F) gc (F) gc (F)
) au (F) ac (F) au (F) ggau (F) c (F) c (F) u (F) c (F) a

SEQ ID NO: 68:

gggagaac (F) u (F) u (F) c (F) gac (F) c (F) agaagu (F) c (F) gagagc (F) gaaagaa
ac (F) u (F) c (F) c (F) c (F) aaaac (F) ac (F) agu (F) au (F) gu (F) gc (F) gc (F) au
(F) ac (F) au (F) ggau (F) c (F) c (F) u (F) c (F) a

- 5 Las actividades de unión para NGF de los ácidos nucleicos mostrados por los SEQ ID NO: 37 - 68 se evaluaron mediante el método de resonancia de plasmón superficial. Se utilizó un método similar al mostrado en el Ejemplo 1 para el experimento. Como resultado, se encontró que todas las secuencias se unían más significativamente a NGF que a 30N de control.

Ejemplo 3: Preparación de aptámero en mosaico de ARN-ADN que se une específicamente a NGF

- 10 Se produjo aptámero en mosaico en donde el ARN era nucleótido de purina y el ADN era nucleótido de pirimidina de acuerdo con el método SELEX. El molde utilizado contenía una secuencia de 40 nucleótidos al azar y los cebadores utilizados fueron diferentes de los utilizados en los Ejemplos 1 y 2. La reserva de ácido nucleico en mosaico de ARN-ADN utilizada en la cebadora ronda se obtuvo transcribiendo ADN sintetizado químicamente como molde, y rATP, rGTP, dCTP y dTTP como sustratos. Aquí, rNTP es ribonucleótido, y dNTP es desoxirribonucleótido. Otros métodos del experimento son casi los mismos que los mostrados en el Ejemplo 1. Las secuencias del molde y el cebador utilizados se muestran a continuación.
- 15

molde de ADN-ARN: 5'-tcctaagtctctctctcttcac-40N-
gccctattcttgcctctccc-3' (SEQ ID NO: 120)

Cebador Directo: 5'-taatacgactcactataggagaggcaagaatagggc-3' (SEQ ID NO: 121)

Cebador Inverso: 5'-tcctaagtctctctcttcac-3' (SEQ ID NO: 122)

- 20 Después de 7 rondas de SELEX, se secuenció la secuencia. No se observó convergencia en las secuencias, pero muchas secuencias contenían la secuencia consenso de TGAAAAAACC (SEQ ID NO: 91). Después de 10 rondas de SELEX, las secuencias se secuenciaron de nuevo. Estuvieron presentes seis secuencias mostradas por el SEQ ID NO: 72, 5 secuencias mostradas por cada uno de los SEQ ID NO: 70 y 71, y 2 secuencias mostradas por los SEQ ID NO: 69 y 73. Además, se encontraron 22 secuencias solamente una vez (incluyendo una secuencia mostrada por el SEQ ID NO: 74), muchas de las cuales contenían la secuencia consenso de UGAAAAAACC (SEQ ID NO: 91).
- 25

Las secuencias de nucleótidos obtenidas en realidad, que correspondían a los SEQ ID NO: 69 - 74, se muestran más abajo. T y C en mayúsculas muestran desoxirribonucleótidos, y a y g en minúsculas muestran ribonucleótidos.

SEQ ID NO: 69:

gggagaggCaagaaTagggCCcagCTgaaaaaaCCTggaCgTaCaCCgTTCgCCgagCggg
TgaagagaagagaCaTTagga

- 30 SEQ ID NO: 70:

gggagaggCaagaaTagggCTggaaaTagaaCCgCgCTgTCTTCaTTaagCCgCCCaaCggT
gaagagaagagaCaTTagga

SEQ ID NO: 71:

gggagaggCaagaaTagggCaCTTgaaaaaaCCaaaTTTaCCgTCTTCagCgTCgggTgT
gaagagaagagaCaTTagga

SEQ ID NO: 72:

gggagaggCaagaaTagggCTggaTgggCagTaaCCTgaaaaaaCCaCCCaCCTCTaCCgT
gaagagaagagaCaTTagga

SEQ ID NO: 73:

gggagaggCaagaaTagggCaCTTgaaaaaaCCaaagaaagaaTaCTTaCCCGgCgCgTg
5 aagagaagagaCaTTagga

SEQ ID NO: 74:

gggagaggCaagaaTagggCaTagTgTagaCCCCCTCTCaagaTaCCCaTgaaTTgCCCCgT
gaagagaagagaCaTTagga

10 Las actividades de unión para NGF de los ácidos nucleicos mostrados por los SEQ ID NO: 69 - 74 se evaluaron mediante el método de resonancia de plasmón superficial. Para el experimento se utilizó un método similar al mostrado en el Ejemplo 1. Como resultado, se encontró que todos ellos se unían más significativamente a NGF que a 40N del control.

Ejemplo 4: Preparación de aptámeros de NGF que tienen una actividad superior

15 Se realizó SELEX utilizando una reserva de ARN que contenía una secuencia mostrada por el SEQ ID NO: 36 dopada con 30% de secuencia al azar y con nuevas secuencias cebadoras añadidas a ambos extremos de la misma. Se realizó SELEX casi de la misma manera que en el Ejemplo 1. Las secuencias del molde y de los cebadores se muestran a continuación.

molde:

5' -

GAGGATCCATGTATGCGCACATAggggttttttcatcctgcagctccacaggcttcccCTTC
TGGTCGAAGTTCT-3'

a: a (70%), g (10%), c (10%), t (10%)

g: g (70%), a (10%), c (10%), t (10%)

c: c (70%), a (10%), g (10%), t (10%)

t: t (70%), a (10%), c (10%), g (10%)

(SEQ ID NO: 123)

Cebador Directo: 5'-CGGAATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGAACTTCGACCAGAAG-3' (SEQ ID NO: 124)

20 Cebador Inverso: 5'-GAGGATCCATGTATGCGCACATA-3' (SEQ ID NO: 125)

Después de 10 rondas, se secuenciaron las secuencias de 48 clones. No se observó convergencia de las secuencias, pero muchas secuencias contenían la secuencia consenso de UGAAAAAACC (SEQ ID NO: 91).

25 Además, también estuvieron presentes UGAAAGAAACC (SEQ ID NO: 92), UGAAAGAAACU (SEQ ID NO: 93), UGAAACAACC (SEQ ID NO: 98), UGAAUAAACC (SEQ ID NO: 99), UGAAUAAACU (SEQ ID NO: 100), UGAAAAAAUCU (SEQ ID NO: 101) y similares, que contenían mutaciones en la secuencia consenso de UGAAAAAACC (SEQ ID NO: 91).

30 A partir de allí se seleccionaron 12 secuencias al azar, y se midieron las actividades de unión para NGF mediante el método de resonancia de plasmón superficial. El método de medición se muestra en el Ejemplo 1. Como resultado de la medición, se encontró que estas 12 secuencias se unían más significativamente a NGF que el cebador molde dopado con 30% de secuencia al azar. Las secuencias de nucleótidos obtenidas en realidad, que correspondían a cada SEQ ID NO, se muestran más abajo.

SEQ ID NO: 75:

gggagaac (F) u (F) u (F) c (F) gac (F) c (F) agaagu (F) gaaagaau (F) c (F) u (F) c
(F) c (F) aaagac (F) aagau (F) aaaaac (F) aac (F) c (F) gu (F) au (F) gu (F) gc (F)
) gc (F) au (F) ac (F) au (F) ggau (F) c (F) c (F) u (F) c (F)

SEQ ID NO: 76:

gggagaac (F) u (F) u (F) c (F) gac (F) c (F) agaaggau (F) aaac (F) gc (F) au (F) g
u (F) au (F) u (F) u (F) gc (F) agu (F) au (F) u (F) aaaaau (F) gc (F) c (F) u (F) u (F)
) au (F) gu (F) gc (F) gc (F) au (F) ac (F) au (F) ggau (F) c (F) c (F) u (F) c (F)

5 SEQ ID NO: 77:

gggagaac (F) u (F) u (F) c (F) gac (F) c (F) agaagu (F) gaaaaau (F) c (F) u (F) c
(F) c (F) agu (F) u (F) gc (F) aagac (F) gaaac (F) aaac (F) c (F) u (F) u (F) au (F)
gu (F) gc (F) gc (F) au (F) ac (F) au (F) ggau (F) c (F) c (F) u (F) c (F)

SEQ ID NO: 78:

gggagaac (F) u (F) u (F) c (F) gac (F) c (F) agaagu (F) gu (F) gu (F) au (F) u (F) g
u (F) u (F) c (F) agggau (F) gu (F) gc (F) c (F) c (F) agc (F) c (F) u (F) au (F) aac (F)
) c (F) au (F) au (F) gu (F) gc (F) gc (F) au (F) ac (F) au (F) ggau (F) c (F) c (F) u (F)
c (F)

10 SEQ ID NO: 79:

gggagaac (F) u (F) u (F) c (F) gac (F) c (F) agaaggau (F) agc (F) c (F) au (F) gu (F)
(F) ggaggau (F) gaagac (F) u (F) gaaau (F) aaac (F) c (F) au (F) au (F) gu (F) gc (F)
) gc (F) au (F) ac (F) au (F) ggau (F) c (F) c (F) u (F) c (F)

SEQ ID NO: 80:

gggagaac (F) u (F) u (F) c (F) gac (F) c (F) agaagu (F) gaaaac (F) aac (F) c (F) u
(F) c (F) c (F) c (F) aaau (F) aaau (F) gau (F) c (F) ac (F) agaaau (F) c (F) c (F) u (F)
) au (F) gu (F) gc (F) gc (F) au (F) ac (F) au (F) ggau (F) c (F) c (F) u (F) c (F)

SEQ ID NO: 81:

gggagaac (F) u (F) u (F) c (F) gac (F) c (F) agaaggagau (F) gac (F) u (F) gu (F) g
u (F) aac (F) c (F) ac (F) agu (F) au (F) gaaau (F) aaac (F) u (F) c (F) u (F) au (F)
gu (F) gc (F) gc (F) au (F) ac (F) au (F) ggau (F) c (F) c (F) u (F) c (F)

15

SEQ ID NO: 82:

gggagaac (F) u (F) u (F) c (F) gac (F) c (F) agaaggagau (F) gc (F) u (F) u (F) gu (F)
(F) u (F) u (F) ggu (F) u (F) ac (F) aagc (F) u (F) gaaagaaac (F) c (F) u (F) u (F) au
(F) gu (F) gc (F) gc (F) au (F) ac (F) au (F) ggau (F) c (F) c (F) u (F) c (F)

SEQ ID NO: 83:

gggagaac (F) u (F) u (F) c (F) gac (F) c (F) agaagu (F) u (F) gaagc (F) u (F) u (F)
gaaaaaac (F) c (F) c (F) aggau (F) u (F) aaac (F) agac (F) agu (F) au (F) gu (F)
gc (F) gc (F) au (F) ac (F) au (F) ggau (F) c (F) c (F) u (F) c (F)

SEQ ID NO: 84:

gggagaac (F) u (F) u (F) c (F) gac (F) c (F) agaagu (F) gaaagaaac (F) u (F) c (F)
c (F) c (F) gau (F) gaaagau (F) gu (F) aac (F) aaac (F) c (F) au (F) au (F) gu (F) g
c (F) gc (F) au (F) ac (F) au (F) ggau (F) c (F) c (F) u (F) c (F)

5 SEQ ID NO: 85:

gggagaac (F) u (F) u (F) c (F) gac (F) c (F) agaagc (F) ggaagc (F) c (F) u (F) gc (F)
F) gu (F) aac (F) c (F) gc (F) aggau (F) gaaaac (F) aac (F) c (F) gu (F) au (F) gu (F)
F) gc (F) gc (F) au (F) ac (F) au (F) ggau (F) c (F) c (F) u (F) c (F)

SEQ ID NO: 86:

gggagaac (F) u (F) u (F) c (F) gac (F) c (F) agaaggagu (F) agc (F) c (F) agu (F) g
aac (F) c (F) u (F) ggaau (F) au (F) gaaaaaac (F) c (F) u (F) u (F) au (F) gu (F) g
c (F) gc (F) au (F) ac (F) au (F) ggau (F) c (F) c (F) u (F) c (F)

Ejemplo 5: Preparación de aptámeros de ADN que se unen específicamente a NGF

- 10 Se prepararon aptámeros de ADN que se unían específicamente a NGF utilizando el método SELEX. El método SELEX utilizado fue un método mejorado del método de Fitzwater, Polisky et al. (Fitzwater y Polisky, Methods Enzymol. 267, 275-301, 1996). Como sustancia diana, se utilizó el NGF humano empleado en el Ejemplo 1. La reserva para la cebadora ronda fue ADN con una longitud de 71 (ADN 40N) obtenido añadiendo secuencias cebadoras a ambos extremos de una secuencia al azar de 40 nucleótidos. Para obtener ADN de hebra sencilla, se
- 15 añadió biotina (bio) al extremo 5' del cebador Inverso.

molde: 5'-GGGATCGACAGGGCT-40N-CCGAGTCGTGCCATCT-3' (SEQ ID NO: 126)

Cebador Directo: 5'-GGGATCGACAGGGCT-3' (SEQ ID NO: 127)

Cebador Inverso: bio-AGATGGCAGCACTCGG-3' (SEQ ID NO: 128)

- 20 Después de completar 7 rondas, se secuenciaron las secuencias de 46 clones de la misma manera que en el Ejemplo 1. Como resultado, estuvieron presentes 20 secuencias mostradas por el SEQ ID NO: 87. Las secuencias de las mismas se muestran a continuación.

SEQ ID NO: 87:

GGGATCGACAGGGCTGCAGCACTGGCGTAGGTTGGAATATGGGTATTTTGTGGTCCGAGTC
GTGCCATCT

Ejemplo 6: Aptámeros que inhiben la unión de NGF y el receptor de NGF

- 25 Se determinó si los aptámeros mostrados por los SEQ ID NO: 1-9, 12, 37-55 y 57-87 inhibían la unión de NGF y el receptor de NGF (TrkA y P75) utilizando el método de resonancia de plasmón superficial. Como se indica en el protocolo de la Compañía BIAcore, se inmovilizó Proteína A (21181, PIERCE) sobre un chip sensor CM5. Se inmovilizaron sobre él aproximadamente 1100 UR de Trk A-Fc humano fusionado con la porción Fc de IgG (175-TK, R&D Systems). En cuanto al analito, se inyectó una mezcla de NGF (0,1 µM) y cada aptámero (0,33 µM) después de
- 30 haberlos dejado en reposo durante 30 minutos. Si el aptámero inhibe la unión de NGF y TrkA, se espera que la señal en el sensograma no aumente; si el aptámero no inhibe la unión, se formará un triple complejo y se espera que la señal aumente. Cuando el NGF se une más fuerte a un receptor que un aptámero, el aptámero puede ser eliminado y el NGF se puede unir al receptor. Antes de empezar el experimento de inhibición, se confirmó la unión de TrkA y NGF. Utilizando la cantidad de unión de NGF y receptor de NGF sin un aptámero como 100, se determinó

la cantidad de unión de NGF y receptor de NGF añadido con un aptámero como un valor de corrección. Aquí, la cantidad de unión es el valor de UR en la parte superior del pico del sensograma de BIAcore (valor de UR inmediatamente después de completarse la inyección de NGF). El valor de corrección se restó de 100 para dar un % de actividad inhibidora, donde no menos de 60% muestra la presencia de actividad inhibidora. Como resultado del experimento, se encontró que todos los aptámeros mostrados por los SEQ ID NO: 1 - 9, 12, 37 - 55, 57 - 87 inhibían la unión de NGF y TrkA (Tabla 1). Como ejemplo, la inhibición de la unión de NGF y TrkA por el aptámero mostrado por el SEQ ID NO: 6 se muestra en la Fig. 12. Se realizó un experimento similar para otro receptor P75 (p75-Fc; R&D Systems). Como resultado, se encontró que todos los aptámeros mostrados por los SEQ ID NO: 1 - 9, 12, 37 - 55, 57 - 87 inhibían la unión de NGF y P75 no menos de 60% (Tabla 1). Como ejemplo, la inhibición de la unión de NGF y P75 por el aptámero mostrado por el SEQ ID NO: 6 se muestra en la Fig. 13.

Tabla 1

		Experimento de inhibición por BIAcore	
		TrKA	P75
SEQ ID NO: 1	79	+	+
SEQ ID NO: 2	78	+	+
SEQ ID NO: 3	79	+	+
SEQ ID NO: 4	79	+	+
SEQ ID NO: 5	79	+	+
SEQ ID NO: 6	79	+	+
SEQ ID NO: 7	79	+	+
SEQ ID NO: 8	78	+	+
SEQ ID NO: 9	79	+	+
SEQ ID NO: 12	79	+	+
SEQ ID NO: 24	69	+	+
SEQ ID NO: 25	47	+	+
SEQ ID NO: 26	46	+	+
SEQ ID NO: 27	45	+	+
SEQ ID NO: 28	40	+	+
SEQ ID NO: 29	61	+	+
SEQ ID NO: 30	41	+	+
SEQ ID NO: 31	34	+	+
SEQ ID NO: 32	38	+	+
SEQ ID NO: 33	36	+	+
SEQ ID NO: 34	34	+	+
SEQ ID NO: 35	38	+	+
SEQ ID NO: 36	35	+	+
SEQ ID NO: 37	74	+	+
SEQ ID NO: 38	74	+	+

		Experimento de inhibición por BIACore	
	Longitud	TrKA	P75
SEQ ID NO: 39	74	+	+
SEQ ID NO: 40	74	+	+
SEQ ID NO: 41	74	+	+
SEQ ID NO: 42	74	+	+
SEQ ID NO: 43	73	+	+
SEQ ID NO: 44	73	+	+
SEQ ID NO: 45	74	+	+
SEQ ID NO: 46	74	+	+
SEQ ID NO: 47	74	+	+
SEQ ID NO: 48	74	+	+
SEQ ID NO: 49	74	+	+
SEQ ID NO: 50	74	+	+
SEQ ID NO: 51	77	+	+
SEQ ID NO: 52	73	+	+
SEQ ID NO: 53	74	+	+
SEQ ID NO: 54	74	+	+
SEQ ID NO: 55	72	+	+
SEQ ID NO: 57	75	+	+
SEQ ID NO: 58	74	+	+
SEQ ID NO: 59	74	+	+
SEQ ID NO: 60	74	+	+
SEQ ID NO: 61	74	+	+
SEQ ID NO: 62	74	+	+
SEQ ID NO: 63	74	+	+
SEQ ID NO: 64	74	+	+
SEQ ID NO: 65	74	+	+
SEQ ID NO: 66	74	+	+
SEQ ID NO: 67	74	+	+
SEQ ID NO: 68	74	+	+
SEQ ID NO: 69	83	+	+
SEQ ID NO: 70	82	+	+

		Experimento de inhibición por BIACore	
	Longitud	TrKA	P75
SEQ ID NO: 71	82	+	+
SEQ ID NO: 72	82	+	+
SEQ ID NO: 73	81	+	+
SEQ ID NO: 74	82	+	+
SEQ ID NO: 75	78	+	+
SEQ ID NO: 76	78	+	+
SEQ ID NO: 77	78	+	+
SEQ ID NO: 78	78	+	+
SEQ ID NO: 79	78	+	+
SEQ ID NO: 80	78	+	+
SEQ ID NO: 81	78	+	+
SEQ ID NO: 82	78	+	+
SEQ ID NO: 83	79	+	+
SEQ ID NO: 84	78	+	+
SEQ ID NO: 85	78	+	+
SEQ ID NO: 86	78	+	+
SEQ ID NO: 87	71	+	+
SEQ ID NO: 88	33	+	+
SEQ ID NO: 89	34	+	+
SEQ ID NO: 90	32	+	+

La Tabla 1 muestra aptámeros que inhiben la unión de TrkA o p75 y NGF. "+" muestra una actividad inhibidora (%) de no menos de 60%, y "-" muestra una de menos de 60%.

- 5 En cuanto al aptámero mostrado por el SEQ ID NO: 87, se realizó un experimento inhibidor similar al mencionado anteriormente en unas condiciones de razón molar de NGF-aptámero de 1:1 (0,1 μ M). Se utilizó la misma mezcla disolvente preparada de NGF y aptámero para los experimentos de TrkA y P75, y el experimento se realizó sin la influencia de variaciones en la preparación de la muestra. Como resultado, el aptámero mostrado por el SEQ ID NO: 87 inhibió la unión de NGF y TrkA en 93%, pero inhibió la unión de NGF y p75 solamente en 29%.

Ejemplo 7: Evaluación de la actividad fisiológica del aptámero utilizando células PC-12

- 10 Se evaluó la actividad fisiológica del aptámero por medio de un experimento supresor del crecimiento de neuritas utilizando células PC-12. Las células PC-12, que son una línea celular derivada de feocromocitoma de glándula suprarrenal de rata, son un modelo de célula del sistema nervioso, prolongan la neuritas por estimulación con NGF, y se diferencian como células nerviosas. Se evaluó si el aptámero inhibe o no el crecimiento de las neuritas. Las células PC-12 se sembraron sobre una placa de fondo plano de 96 pocillos recubierta con colágeno, y se añadió una
- 15 mezcla disolvente de NGF (concentración final 25 ng/mL o 1,9 nM) que se había hecho reaccionar previamente durante 1 hr a 37°C y un aptámero (concentración final 500 nM) para iniciar el cultivo celular. Después de eso, se añadió la misma cantidad de aptámero dos veces cada 24 horas y se observó el nivel de crecimiento de las neuritas y se evaluó el día 3 con un microscopio. Para la evaluación, se utilizaron puntuaciones de 0 - 3, donde la puntuación 0 representa sin crecimiento de las neuritas, la puntuación 1 representa un ligero crecimiento de las neuritas, la

puntuación 2 representa crecimiento de las neuritas hasta la célula cercana, y la puntuación 3 representa crecimiento de las neuritas marcadamente reticulado. El sistema en donde se cultivaron las células PC-12 durante 3 días con la adición de NGF solo se tomó como control negativo, y el sistema competente en donde se cultivaron las células durante 3 días sin adición de NGF se tomó como control positivo. Para confirmar la supresión del crecimiento de las neuritas por un inhibidor de NGF, se añadió anticuerpo anti-NGF 133 nM (MAB2561, R&D Systems) como inhibidor de NGF de control con NGF, las células se cultivaron durante 3 días y se confirmó la supresión del crecimiento de las neuritas. Se calculó el ajuste de la puntuación del control negativo como actividad inhibidora de 0%, y la puntuación del control positivo como actividad inhibidora de 100%, de la actividad inhibidora (%) del aptámero. Los resultados se muestran en la Tabla 2. Una actividad inhibidora de no menos de 50% se muestra con +, y aquella de menos de 50% se muestra con -. Se aclaró que los aptámeros mostrados por los SEQ ID NO: 1, 3 - 9 y 12 inhibían notablemente el crecimiento de las neuritas (Tabla 2). El aptámero mostrado por el SEQ ID NO: 2 libre de una secuencia consenso no mostró una actividad inhibidora. Por otra parte, los aptámeros mostrados por los SEQ ID NO: 5, 6 y similares que contenían una secuencia consenso mostraron una actividad inhibidora. El aptámero mostrado por el SEQ ID NO: 8 mostró una actividad inhibidora, incluso aunque estuviera libre de una secuencia consenso. Lo anterior demuestra que los aptámeros mostrados por los SEQ ID NO: 1, 3 - 9 y 12 pueden ser inhibidores de NGF.

Tabla 2

	Actividad inhibidora
SEQ ID NO: 1	+
SEQ ID NO: 2	-
SEQ ID NO: 3	+
SEQ ID NO: 4	+
SEQ ID NO: 5	+
SEQ ID NO: 6	+
SEQ ID NO: 7	+
SEQ ID NO: 8	+
SEQ ID NO: 9	+
SEQ ID NO: 12	+
SEQ ID NO: 24	-
SEQ ID NO: 25	-
SEQ ID NO: 26	-
SEQ ID NO: 27	-
SEQ ID NO: 28	+
SEQ ID NO: 29	+
SEQ ID NO: 30	+
SEQ ID NO: 30(1)	+
SEQ ID NO: 30(2)	+
SEQ ID NO: 30(3)	+
SEQ ID NO: 31	-
SEQ ID NO: 32	+
SEQ ID NO: 32(1)	+

	Actividad inhibidora
SEQ ID NO: 32(2)	+
SEQ ID NO: 32(3)	+
SEQ ID NO: 33	-
SEQ ID NO: 34	-
SEQ ID NO: 35	+
SEQ ID NO: 35(1)	+
SEQ ID NO: 35(2)	+
SEQ ID NO: 35(3)	+
SEQ ID NO: 36	-
SEQ ID NO: 88	-
SEQ ID NO: 89	-
SEQ ID NO: 90	-
Anticuerpo	+
anti-NGF	

La Tabla 2 muestra aptámeros capaces de inhibir el crecimiento de las neuritas de las células PC12. Una actividad inhibidora de no menos de 50% es "+", y la de menos de 50% es "-".

Ejemplo 8: Evaluación de la actividad fisiológica de un aptámero utilizando células Neuroscreen-1

- 5 Se evaluó la actividad inhibidora del crecimiento de neuritas del aptámero utilizando células Neuroscreen-1, que son subclones de células PC-12. Se cultivaron 2500 células por pocillo durante un día en medio RPMI-1640 que contenía suero de caballo al 2,5% y suero bovino fetal al 1,25% en una placa de fondo plano de 96 pocillos recubierta con colágeno de tipo IV. Se añadió una mezcla disolvente de NGF (concentración final 15 ng/mL o 1,1 nM) que previamente había reaccionado en medio RPMI-1640 libre de suero a la temperatura ambiente o a 37°C
- 10 durante 30 min a 1 hr y un aptámero (concentración final 500 - 3 nM). Dos o tres días más tarde, se tiñeron el citoplasma y los núcleos utilizando Cellomics Neurite Outgrowth Kits (fabricado por Thermo Scientific), y se midió el crecimiento en longitud de las neuritas por medio de Cellomics ArrayScan VTI (fabricado por Thermo Scientific). Tomando la longitud de las neuritas por célula obtenida cultivando la célula durante 2 días con la adición de NGF solo como actividad inhibidora de 0%, y la de la célula obtenida por medio de cultivo libre de NGF como actividad
- 15 inhibidora de 100%, se calculó la actividad inhibidora del aptámero a partir de la longitud de las neuritas por célula obtenida cultivando con la adición de NGF y el aptámero mezclados. La actividad inhibidora cuando las concentraciones de aptámero fueron de 100 nM y 10 nM, y la concentración inhibidora del 50% (CI50) se muestran en la Tabla 3. Cuando la actividad inhibidora fue de 0% o menor, se indica '0%'. Cuando fue no menor de 100%, se indica '100%'. La concentración inhibidora del 50% se determinó a partir de las concentraciones en dos puntos, por
- 20 encima y por debajo, del sándwich de la actividad inhibidora del 50%. Un valor de CI50 indicado como < representa una actividad inhibidora de no menos de 50% incluso a la concentración de medición más baja, y el número indicado muestra la concentración de medición más baja. Como resultado del experimento, se confirmó la presencia de aptámeros que tenían una elevada actividad que mostraban una CI50 de 10 nM o menor.

Tales aptámeros contenían las secuencias consenso de

- 25 UGAAAAAAACC (SEQ ID NO: 91), UGAAAGAAACC (SEQ ID NO: 92),
 UGAAAGAAACU (SEQ ID NO: 93), UGAAAAGAACC (SEQ ID NO: 95),
 UGAAAAAACCC (SEQ ID NO: 96), UGAAAGGAACC (SEQ ID NO: 105),
 CGAACAAAACU (SEQ ID NO: 103), CGAAAGAAACU (SEQ ID NO: 104) y AGAAUGAAACU (SEQ ID NO: 102).
 Seis clases y 5 clases de aptámeros contenían UGAAAAAAACC (SEQ ID NO: 91) y UGAAAGAAACC (SEQ ID NO: 92), respectivamente.
- 30

Tabla 3

	100 nM	10 nM	CI50 (nM)
SEQ ID NO: 5	96,5	0,0	21,0
SEQ ID NO: 6	98,6	20,1	17,7
SEQ ID NO: 12	92,8	0,0	43,4
SEQ ID NO: 30	81,9	29,2	57,6
SEQ ID NO: 30(5)	93,7	N.D.	<100
SEQ ID NO: 30(6)	98,2	16,2	58,9
SEQ ID NO: 32	64,0	0,0	84,7
SEQ ID NO: 35	57,0	0,0	91,5
SEQ ID NO: 35(1)	54,1	0,0	94,7
SEQ ID NO: 35(5)	70,3	0,0	79,8
SEQ ID NO: 35(6)	80,4	0,0	73,5
SEQ ID NO: 37	98,9	96,0	6,6
SEQ ID NO: 38	98,1	82,2	7,3
SEQ ID NO: 39	99,0	98,8	6,3
SEQ ID NO: 40	99,6	100,0	2,4
SEQ ID NO: 42	96,1	98,3	6,6
SEQ ID NO: 43	97,3	67,4	<10
SEQ ID NO: 44	99,4	0,0	26,1
SEQ ID NO: 45	99,1	12,3	20,2
SEQ ID NO: 46	99,3	0,0	25,4
SEQ ID NO: 47	98,2	35,9	14,6
SEQ ID NO: 48	97,8	0,0	46,4
SEQ ID NO: 49	98,3	97,9	4,6
SEQ ID NO: 50	97,5	0,0	25,4
SEQ ID NO: 51	99,4	45,1	11,9
SEQ ID NO: 52	99,8	95,3	6,7
SEQ ID NO: 53	100,0	53,4	<10
SEQ ID NO: 54	94,4	76,0	7,6
SEQ ID NO: 55	96,2	0,0	49,9
SEQ ID NO: 56	92,8	19,2	18,8
SEQ ID NO: 57	94,1	96,8	6,4

	100 nM	10 nM	CI50 (nM)
SEQ ID NO: 59	84,4	0,0	71,5
SEQ ID NO: 60	99,8	99,1	2,2
SEQ ID NO: 61	99,7	0,0	20,7
SEQ ID NO: 62	100,0	99,6	2,0
SEQ ID NO: 63	100,0	52,0	<10
SEQ ID NO: 64	100,0	96,1	4,8
SEQ ID NO: 65	100,0	0,0	22,2
SEQ ID NO: 66	100,0	68,7	<10
SEQ ID NO: 67	99,6	96,1	2,7
SEQ ID NO: 68	100,0	99,8	1,9
SEQ ID NO: 83	90,0	84,6	7,1
SEQ ID NO: 84	92,7	37,5	14,6
(N.D. en la Tabla representa no medido.)			

La Tabla 3 muestra la actividad inhibidora (%) cuando las concentraciones del aptámero que inhibe el crecimiento de neuritas de las células Neuroscreen-1 fueron de 100 nM y 10 nM, y la concentración inhibidora del 50% (CI50).

Ejemplo 9: acortamiento de cadena del aptámero

- 5 Se llevó a cabo el acortamiento de cadena de los aptámeros mostrados por los SEQ ID NO: 2, 5, 6, 8. Los aptámeros mostrados por los SEQ ID NO: 5, 6 contienen una secuencia consenso de UGAAAAAAACC (SEQ ID NO: 91). Los aptámeros mostrados por los SEQ ID NO: 2 y 8 no contienen semejante secuencia consenso. Las secuencias de las variantes se describen a continuación.

SEQ ID NO: 24: aptámero de 69 nucleótidos que es una variante del aptámero mostrado por el SEQ ID NO: 2

gggaagc (F) c (F) u (F) gu (F) ggagc (F) u (F) gc (F) c (F) u (F) ac (F) ac (F) u (F)
 u (F) u (F) agu (F) au (F) gac (F) aaac (F) c (F) u (F) agagu (F) gu (F) aaau (F) gc
 10 (F) u (F) u (F) c (F) gc (F) au (F) u (F) gu (F) c (F) ac (F) c (F)

SEQ ID NO: 25: aptámero de 47 nucleótidos que es una variante del aptámero mostrado por el SEQ ID NO: 2

ggagc (F) u (F) gc (F) c (F) u (F) ac (F) ac (F) u (F) u (F) u (F) agu (F) au (F) gac (F)
 F) aaac (F) c (F) u (F) agagu (F) gu (F) aaau (F) gc (F) u (F) u (F) c (F)

SEQ ID NO: 26: aptámero de 46 nucleótidos que es una variante del aptámero mostrado por el SEQ ID NO: 5

gggc (F) u (F) gu (F) ggagc (F) u (F) gc (F) u (F) u (F) aaac (F) aagc (F) aagu (F)
 gaaaaaac (F) c (F) ac (F) agc (F) c (F) c (F)

- 15 SEQ ID NO: 27: aptámero de 45 nucleótidos que es una variante del aptámero mostrado por el SEQ ID NO: 6

gggaagc (F) c (F) u (F) gu (F) ggagc (F) u (F) gc (F) aggau (F) gaaaaaac (F) c (F)
 F) c (F) aaau (F) u (F) aaau (F)

SEQ ID NO: 28: aptámero de 40 nucleótidos que es una variante del aptámero mostrado por el SEQ ID NO: 6

gggaagc (F) c (F) u (F) gu (F) ggagc (F) u (F) gc (F) aggau (F) gaaaaaac (F) c (F) c (F) aaaau (F)

SEQ ID NO: 29: aptámero de 61 nucleótidos que es una variante del aptámero mostrado por el SEQ ID NO: 8

ggu (F) ggagc (F) u (F) gc (F) ggau (F) aaaaau (F) agagu (F) u (F) u (F) gau (F) aac (F) ac (F) c (F) u (F) gu (F) au (F) u (F) aaaac (F) c (F) gc (F) au (F) u (F) gu (F) c (F) ac (F) c (F)

5 SEQ ID NO: 30: aptámero de 41 nucleótidos que es una variante del aptámero mostrado por el SEQ ID NO: 8

gggau (F) aaaaau (F) agagu (F) u (F) u (F) gau (F) aaac (F) ac (F) c (F) u (F) gu (F) au (F) u (F) aaaac (F) c (F) c (F)

SEQ ID NO: 31: aptámero de 34 nucleótidos que es una variante del aptámero mostrado por el SEQ ID NO: 26

gggagc (F) u (F) gc (F) u (F) u (F) aaac (F) aagc (F) aagu (F) gaaaaaac (F) c (F) c (F)

SEQ ID NO: 32: aptámero de 38 nucleótidos que es una variante del aptámero mostrado por el SEQ ID NO: 26

u (F) gu (F) ggagc (F) u (F) gc (F) u (F) u (F) aaac (F) aagc (F) aagu (F) gaaaaaac (F) c (F) c (F) ac (F) a

10

SEQ ID NO: 33: aptámero de 36 nucleótidos que es una variante del aptámero mostrado por el SEQ ID NO: 26

u (F) gu (F) ggagc (F) u (F) gc (F) u (F) aaac (F) agc (F) aagu (F) gaaaaaac (F) c (F) ac (F) a

SEQ ID NO: 34: aptámero de 34 nucleótidos que es una variante del aptámero mostrado por el SEQ ID NO: 26

gu (F) ggagc (F) u (F) gu (F) u (F) aaac (F) aac (F) aagu (F) gaaaaaac (F) c (F) ac (F)

15 SEQ ID NO: 35: aptámero de 38 nucleótidos que es una variante del aptámero mostrado por el SEQ ID NO: 28

gggaagc (F) c (F) u (F) gu (F) ggagc (F) u (F) gc (F) aggau (F) gaaaaaac (F) c (F) c (F) aaa

SEQ ID NO: 36: aptámero de 35 nucleótidos que es una variante del aptámero mostrado por el SEQ ID NO: 28

gggaagc (F) c (F) u (F) gu (F) ggagc (F) u (F) gc (F) aggau (F) gaaaaaac (F) c (F) c (F)

SEQ ID NO: 88: aptámero de 33 nucleótidos que es una variante del aptámero mostrado por el SEQ ID NO: 36

gggaagc (F) c (F) gu (F) ggagc (F) u (F) gc (F) ggau (F) gaaaaaac (F) c (F) c (F)

20

SEQ ID NO: 89: aptámero de 34 nucleótidos que es una variante del aptámero mostrado por el SEQ ID NO: 36

gggaagc (F) c (F) u (F) gu (F) aaac (F) agc (F) aggau (F) gaaaaaac (F) c (F) c (F)

SEQ ID NO: 90: aptámero de 32 nucleótidos que es una variante del aptámero mostrado por el SEQ ID NO: 36

gggagc(F)c(F)u(F)gu(F)aaac(F)agc(F)aggu(F)gaaaaaac(F)c(F)c(F)

- 5 Las supuestas estructuras secundarias de los aptámeros mostrados por los SEQ ID NO: 31 y 36 se muestran en la Fig. 14 y la Fig. 15. La secuencia consenso se muestra con un círculo de color negro.

Se prepararon aptámeros con una longitud de 40 nucleótidos o más mediante transcripción y se prepararon aptámeros con una longitud menor que esa mediante síntesis química. Se examinó si estos ácidos nucleicos inhibían la unión de NGF y el receptor de NGF de la misma manera que en el Ejemplo 6 mediante el método de resonancia de plasmón superficial. Como resultado, se encontró que todos estos ácidos nucleicos tenían una actividad inhibidora (Tabla 1).

10

Además, se examinó la actividad inhibidora del crecimiento de neuritas contra células PC12 de la misma manera que en el Ejemplo 7. Como resultado, se encontró una fuerte actividad inhibidora en los SEQ ID NO: 28 - 30, 32, 35 (Tabla 2).

15

El aptámero mostrado por el SEQ ID NO: 32 ha sido acortado en 38 nucleótidos manteniendo la secuencia consenso del aptámero mostrado por el SEQ ID NO: 5. Además, al aptámero mostrado por el SEQ ID NO: 35 se ha acortado en 38 nucleótidos manteniendo la secuencia consenso del aptámero mostrado por el SEQ ID NO: 6. A partir de lo anterior, se ha demostrado que la secuencia consenso es importante al menos para los SEQ ID NO: 5 y 6.

20

Por otra parte, el aptámero mostrado por el SEQ ID NO: 30 es una secuencia de cadena acortada del aptámero mostrado por el SEQ ID NO: 8 libre de la secuencia consenso, y se confirmó la actividad con la longitud de 41 nucleótidos. Se demostró que estos aptámeros eran utilizables como inhibidores de NGF.

Ejemplo 10: Modificación de aptámeros de cadena acortada

25

Para potenciar la estabilidad de los aptámeros mostrados por los SEQ ID NO: 30, 32, 35 en sangre, se prepararon variantes en donde el grupo hidroxilo de la posición 2' de la ribosa había sido remplazado por un grupo o-metilo. De la misma manera que en el Ejemplo 7, se examinó la inhibición de crecimiento de neuritas por las células PC12. Como resultado, todos estos aptámeros mostraron una fuerte actividad inhibidora.

Las secuencias de las formas modificadas se muestran más abajo. Los paréntesis en los nucleótidos muestran la modificación de la posición 2', F es un átomo de flúor, M es un grupo o-metilo, e idT es dT invertida.

30

SEQ ID NO: 30(1):

idT-

gggau (F) aaaaau (F) a (M) g (M) a (M) g (M) u (F) u (F) u (F) g (M) a (M) u (F) a (M) a (M) a (M) c (F) a (M) c (F) c (F) u (F) gu (F) au (F) u (F) aaaac (F) c (F) c (F) -idT

SEQ ID NO: 30(2):

gggau (F) aaaa (M) a (M) u (F) agagu (F) u (F) u (F) gau (F) aaac (F) ac (F) c (F) u (F) gu (F) au (F) u (F) aaaac (F) c (F) c (F)

SEQ ID NO: 30(3):

gggau (F) aaaaau (F) agagu (F) u (F) u (F) gau (F) aaac (F) ac (F) c (F) u (F) gu (F) au (F) u (F) a (M) a (M) aac (F) c (F) c (F)

35

SEQ ID NO: 30(4):

idT-

gggau (F) aaaa (M) a (M) u (F) a (M) g (M) a (M) g (M) u (F) u (F) u (F) g (M) a (M) u (F)
) a (M) a (M) a (M) c (F) a (M) c (F) c (F) u (F) gu (F) au (F) u (F) a (M) a (M) aac (F) c
(F) c (F) -idT

SEQ ID NO: 30(5):

idT-

gggau (F) aaaa (M) a (M) u (F) a (M) g (M) a (M) g (M) u (F) u (F) u (F) g (M) a (M) u (F)
) a (M) a (M) a (M) c (F) a (M) c (F) c (F) u (F) gu (F) a (F) u (F) u (F) a (M) a (M) a (F)
a (F) c (F) c (F) c (F) -idT

5 SEQ ID NO: 30(6):

idT-

g (M) g (M) g (M) au (F) a (M) aa (M) a (M) a (M) u (F) a (M) g (M) a (M) g (M) u (F) u (F)
u (F) g (M) a (M) u (F) a (M) a (M) a (M) c (F) a (M) c (F) c (F) u (F) gu (F) a (M) u (F) u
(F) a (M) a (M) a (F) a (F) c (F) c (F) c (F) -idT

SEQ ID NO: 32(1):

idT-

u (F) gu (F) ggagc (F) u (F) g (M) c (F) u (F) u (F) a (M) a (M) a (M) c (F) a (M) a (M) g
(M) c (F) a (M) a (M) g (M) u (F) gaaaaaac (F) c (F) ac (F) a-idT

SEQ ID NO: 32(2):

10

u (F) g (M) u (F) ggagc (F) u (F) gc (F) u (F) u (F) aaac (F) aagc (F) aagu (F) gaaa
aaaac (F) c (F) ac (F) a (M)

SEQ ID NO: 32(3):

u (F) gu (F) ggagc (F) u (F) gc (F) u (F) u (F) aaac (F) aagc (F) aagu (F) gaaaa (M)
) a (M) aac (F) c (F) ac (F) a

SEQ ID NO: 32(4):

u (F) gu (F) gga (M) gc (F) u (F) gc (F) u (F) u (F) aaac (F) aagc (F) aagu (F) gaaa
aaaac (F) c (F) ac (F) a

15

SEQ ID NO: 32(5):

idT-

u (F) g (M) u (F) gga (M) gc (F) u (F) g (M) c (F) u (F) u (F) a (M) a (M) a (M) c (F) a (M)
) a (M) g (M) c (F) aagu (F) gaaaa (M) a (M) a (M) a (M) c (F) c (F) ac (F) a-idT

SEQ ID NO: 32(6):

idT-

u (F) g (M) u (F) g (M) ga (M) gc (F) u (F) g (M) c (F) u (F) u (F) a (M) a (M) a (M) c (F)
a (M) a (M) g (M) c (F) a (M) a (M) g (M) u (F) gaaaa (M) a (M) a (M) a (M) c (F) c (F) ac
(F) a-idT

SEQ ID NO: 35(1):

idT-

ggga (M) a (M) g (M) c (F) c (F) u (F) g (M) u (F) g (M) g (M) a (M) g (M) c (F) u (F) g (M)
) c (F) a (M) g (M) g (M) au (F) gaaaaaac (F) c (F) c (F) aaa-idT

5 SEQ ID NO: 35(2):

idT-

ggga (M) a (M) g (M) c (F) c (F) u (F) g (M) u (F) ggagc (F) u (F) g (M) c (F) a (M) g (M)
) g (M) au (F) gaaaa (M) a (M) a (M) a (M) c (F) c (F) c (F) aaa-idT

SEQ ID NO: 35(3):

gggaagc (F) c (F) u (F) gu (F) ggagc (F) u (F) gc (F) aggau (F) gaaaaaac (F) c (F)
F) c (F) a (M) a (M) a (M)

SEQ ID NO: 35(4):

idT-

ggga (M) a (M) g (M) c (F) c (F) u (F) g (M) u (F) g (M) g (M) a (M) g (M) c (F) u (F) g (M)
) c (F) a (M) g (M) g (M) au (F) gaaaa (M) a (M) a (M) a (M) c (F) c (F) c (F) a (M) a (M)
a (M) -idT

10

SEQ ID NO: 35(5):

idT-

g (M) g (M) ga (M) a (M) g (M) c (F) c (F) u (F) g (M) u (F) g (M) g (M) a (M) g (M) c (F) u
(F) g (M) c (F) a (M) g (M) g (M) au (F) gaaaa (M) a (M) a (M) a (M) c (F) c (F) c (F) a (

SEQ ID NO: 35(6):

idT-

g (M) g (M) ga (M) a (M) g (M) c (F) c (F) u (F) g (M) u (F) g (M) g (M) a (M) g (M) c (F) u
(F) g (M) c (F) a (M) g (M) g (M) a (F) u (F) gaaaa (M) a (M) a (M) a (M) c (F) c (F) c (F)
) a (M) a (M) a (M) -idT

15 Ejemplo 11: Identificación del sitio de unión a NGF del aptámero mediante el método de la huella dactilar

Para confirmar que la secuencia consenso es un sitio de unión a NGF, se realizó un experimento de digestión con enzimas en ausencia de NGF y en presencia de NGF. Cuando la secuencia consenso es un sitio de unión a NGF, los resultados deben ser que se produce la digestión con la enzima en ausencia de NGF; la nucleasa no se puede unir a una secuencia consenso en presencia de NGF y no se produce la digestión con la enzima. Utilizando un aptámero en donde se conjugó una sustancia fluorescente (FAM6) con el extremo 5' o el extremo 3' del aptámero mostrado por el SEQ ID NO: 62, se llevó a cabo el experimento. El aptámero mostrado por el SEQ ID NO: 62 contiene una secuencia consenso de UGAAAGAAACC (SEQ ID NO: 92). En cuanto a la nucleasa, se utilizaron 3

20

clases de nucleasa S1 (fabricada por TAKARA BIO) que escinde selectivamente hebras sencillas, nucleasa V1 (fabricada por Ambion) que escinde selectivamente dobles hebras, y nucleasa T1 (fabricada por Ambion) que escinde selectivamente G de las hebras sencillas. Cada reacción enzimática se llevó a cabo en las condiciones de la Tabla 4 en referencia al documento de la memoria descriptiva adjunto. A la disolución de reacción de la nucleasa S1 se le añadió ZnCl_2 0,833 mM.

[Tabla 4]

Nucleasa	Cantidad de enzima (U/ μL)	Cantidad de aptámero (μM)	Tiempo	Temperatura
S1	8,33	8	3 min, 10 min	temperatura ambiente
V1	0,009	9	1 min, 3 min	temperatura ambiente
T1	0,91	9	1 min, 3 min	temperatura ambiente

En el experimento con adición de NGF, la razón molar de aptámero y NGF se ajustó a 1:2, y se disolvieron en disolución B, un tampón de unión. Aquí, la disolución B es una mezcla disolvente de cloruro de sodio 145 mM, cloruro de potasio 5,4 mM, cloruro de calcio 1,8 mM, cloruro de magnesio 0,8 mM, y Tris 20 mM (pH 7,6).

Después de una reacción con enzima, la reacción se interrumpió mediante tratamiento con fenol-choroformo, y se recuperó y se concentró una fracción soluble en agua. A continuación, se eliminó el ácido fosfórico terminal por medio de fosfatasa alcalina (fabricada por TAKARA BIO). El tratamiento enzimático con fosfatasa alcalina se realizó a 37°C durante 1,5 hr mediante referencia al documento de la memoria descriptiva adjunto. Estas muestras se analizaron mediante electroforesis en poliacrilamida desnaturalizada al 20%. Para la detección de la fluorescencia, se utilizó Storm850 (fabricado por GE Healthcare). Como resultado del experimento, se escindió GAAAGA de UGAAAGAAACC (SEQ ID NO: 92) por medio de las nucleasas S1 y T1 en ausencia de NGF. Por otra parte, la escisión fue notablemente suprimida en presencia de NGF. Aquí, el nucleótido de pirimidina es una forma modificada con flúor. Lo anterior revela que la porción de la secuencia consenso es un sitio de unión a NGF.

Ejemplo 12: Cambios en la actividad por introducción de mutaciones en la porción de la secuencia consenso

Se introdujo una mutación en la porción de la secuencia consenso, y se evaluaron los cambios en la actividad utilizando células Neuroscreen-1 de la misma manera que en el Ejemplo 8. Como aptámero que contenía una secuencia consenso UGAAAAAAACC (SEQ ID NO: 91), se utilizó una secuencia de 38 nucleótidos de longitud mostrada por el SEQ ID NO: 35. Los resultados del mismo se muestran en la Tabla 5.

Cuando se añadía un aptámero libre de introducción de mutación a 300 nM, se observaba la inhibición del crecimiento de neuritas en 92%. Por otra parte, la actividad desaparecía completamente mediante la introducción de una mutación de un nucleótido. Cuando la A del 3^{er} al 5^o de UGAAAAAAACC (SEQ ID NO: 91) era sustituida por un tipo de ADN, la actividad desaparecía completamente. A partir de lo anterior, se demostró que la secuencia consenso era importante para la inhibición de la actividad de NGF.

[Tabla 5]

Secuencia consenso	300 nM (% Inhibición)
UGAAAAAAACC	92
U <u>C</u> AAAAAAACC	0
UgAAAAAAACC	0
UG <u>G</u> AAAAAAACC	0
UG <u>a</u> AAAAAAACC	0
UGA <u>a</u> AAAAAAACC	0
UGAA <u>a</u> AAAAAAACC	0

La Tabla 5 muestra los resultados del experimento inhibitor del crecimiento de neuritas utilizando células Neuroscreen-1. El aptámero mostrado por el SEQ ID NO: 35 y una variante del mismo se añadieron a 300 nM. El nucleótido de pirimidina es una forma modificada con flúor, las letras mayúsculas del nucleótido de purina muestran

el tipo ARN, y las letras minúsculas muestran el tipo ADN. La mutación se introdujo en las porciones subrayadas.

Ejemplo 13: Consideración referente a las secuencias consenso

En este experimento, las secuencias consenso aparecían con una frecuencia elevada en SELEX en diferentes condiciones tales como diferentes reservas, secuencias de cebadores y similares (Ejemplos 1 - 4). De las 74 secuencias obtenidas por medio de SELEX, 59 secuencias contenían aptámeros que tenían una secuencia consenso de UGAAANNANCY (SEQ ID NO: 107), en donde N es cualquier nucleótido de A, G, C y U, y U puede ser T. Y es un nucleótido de pirimidina. De estas, 29 secuencias contenían UGAAAAAAACY (SEQ ID NO: 110) y 13 secuencias contenían UGAAAGAAACY (SEQ ID NO: 111).

Por otra parte, las secuencias consenso mostradas por las fórmulas CGAANNAAACY (SEQ ID NO: 108) y AGAANNAAACY (SEQ ID NO: 109) se encontraron en 3 secuencias y 2 secuencias, respectivamente. De estas, una secuencia contenía CGAACAAAACY (SEQ ID NO: 112), y una secuencia contenía CGAAAGAAACY (SEQ ID NO: 113). Éstas se pueden mostrar por la fórmula HGAANNNANCY (SEQ ID NO: 106).

Puesto que estas secuencias consenso son necesarias para la forma de cadena acortada de 38 nucleótidos (Ejemplo 9), están protegidas mediante la adición de NGF en un experimento de digestión con enzima (Ejemplo 11), y su actividad fisiológica disminuye marcadamente por la introducción de una mutación (Ejemplo 12), está claro que son importantes para inhibir la función de NGF.

Ejemplo 14: Introducción de mutaciones en un aptámero de cadena acortada

Se confirmó si la actividad se podía mantener después de la introducción de una mutación en un aptámero de cadena acortada. El aptámero del SEQ ID NO: 30(6) tenía una longitud de 41 nucleótidos y no contenía una secuencia consenso. Se añadió dT invertida a los extremos 5' y 3'. Se evaluó la actividad utilizando células Neuroscreen-1 de la misma manera que en el Ejemplo 8. Los resultados se muestran en la Tabla 6.

Cuando se sustituyeron los pares de bases G1:C41, A10:U33, A12:U31 en la porción de tallo pronosticada por el programa MFOLD por C1:G41, U10:A33, U12:A31, la actividad no disminuyó marcadamente. Cuando G20 y G23 en la porción bucle se sustituyeron por A20 y A23, la actividad no disminuyó marcadamente, tampoco. A partir de lo anterior, se demuestra que la actividad del aptámero mostrado por el SEQ ID NO: 30(6) se mantuvo incluso después de la introducción de varias mutaciones.

[Tabla 6]

(% Inhibición)			
	300 nM	100 nM	30 nM
G1:C41→C:G	98,1	92,0	19,5
A10:U33→U:A	98,3	80,8	12,1
A12:U31→U:A	96,0	93,1	35,8
G20→A	98,1	96,1	47,7
G23→A	98,0	91,2	31,0
SEQ ID NO: 30	98,6	92,7	28,4

Ejemplo 15: Comparación con el aptámero de NGF descrito en la referencia de la técnica anterior

Los aptámeros mostrados por los SEQ ID NO: 30, 32, 35 y los aptámeros de NGF descritos en la referencia de la técnica anterior (Binkley J et al., (1995) Nucleic Acids Res. 23, 3198) se compararon para determinar la actividad de unión a NGF, la actividad inhibidora de la unión de NGF-receptor de NGF y la actividad inhibidora del crecimiento de neuritas.

Los aptámeros descritos en la referencia de la técnica anterior eran todos ADN no modificados, y las secuencias de los mismos no coincidían con las secuencias descritas en la presente memoria descriptiva. Como aptámeros descritos en la referencia de la técnica anterior se seleccionaron H1, L2 y L6 que mostraban una elevada actividad de unión, y se transcribieron con polimerasa T7. Se evaluó la actividad de unión mediante un método similar al del Ejemplo 1, se evaluó la actividad inhibidora de la unión de NGF-receptor de NGF mediante un método similar al del Ejemplo 6, y se evaluó la actividad inhibidora del crecimiento de neuritas mediante un método similar al del Ejemplo 8.

Como resultado, se encontró que H1, L2 y L6 se unían a NGF pero la actividad era menor que la de los aptámeros mostrados por los SEQ ID NO: 30, 32, 35 (Tabla 7). Por otra parte, H1, L2 y L6 no inhibieron la unión de NGF y receptor de NGF, y no mostraron una actividad inhibidora ni siquiera cuando se añadieron a 500 nM en el experimento de inhibición del crecimiento de neuritas (Tabla 7). A partir de lo anterior, se demostró que los aptámeros descritos en la presente memoria descriptiva tienen una mayor actividad que los aptámeros descritos en la referencia de la técnica anterior.

[Tabla 7]

	Unión con NGF (BIACore)	Inhibición de la unión de NGF-receptor de NGF		Actividad inhibidora del crecimiento de neuritas de NGF (%)	
		TrkA	P75	500 nM	250 nM
SEQ ID NO: 30	++	+	+	100,0	100,0
SEQ ID NO: 32	++	+	+	100,0	97,4
SEQ ID NO: 35	++	+	+	100,0	94,5
H1	+	-	-	0,0	0,0
L2	-	-	-	0,0	0,0
L6	-	-	-	0,0	0,0

La Tabla 7 muestra la actividad de unión a NGF, la inhibición de la unión de NGF-receptor de NGF, y la actividad inhibidora del crecimiento de neuritas de NGF de los aptámeros mostrados por los SEQ ID NO: 30, 32, 35 y los aptámeros H1, L2, L6 descritos en el documento no de patente 1.

La actividad de unión a NGF se evaluó basándose en el valor UR máximo obtenido mediante la unión de NGF y el SEQ ID NO: 35 como 100%. Cuando no es menor de 80%, se indica "++", cuando no es menor de 50%, se indica "+", y cuando es 50% o menos, se indica "-". En cuanto a la inhibición de la unión de NGF-receptor de NGF, "+" representa una actividad inhibidora (%) de no menos de 60%, y "-" representa una actividad inhibidora (%) de menos de 60%.

La actividad inhibidora del crecimiento de neuritas de NGF es la actividad inhibidora (%) cuando la concentración final del aptámero es de 500 nM o 250 nM.

Aplicabilidad industrial

El aptámero de la presente invención y el complejo pueden ser útiles como medicamentos, agentes de diagnóstico o reactivos para enfermedades tales como dolor, enfermedad inflamatoria y similares. El aptámero de la presente invención y el complejo también pueden ser útiles para la purificación y concentración de NGF, así como para la detección y cuantificación de NGF.

Esta solicitud se basa en la solicitud de patente Núm. 2008-244982 presentada en Japón (fecha de presentación: 24 Septiembre de 2008).

Listado de secuencias

	<110> RIBOMIC INC. shionogi & Co., Ltd.	
	<120> Aptámero para NGF y uso del mismo	
	<130> T1620 EP	
5	<150> JP2008-244982	
	<151> 2008-09-24	
	<160> 128	
	<170> PatentIn version 3.3	
10	<210> 1	
	<211> 79	
	<212> RNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra NGF	
15	<400> 1	
	gggaagccug uggagcugca ggaugaaaaa aacccaaaaa caaagacaau gauugaguag	60
	cauugucacc aacaacugg	79
	<210> 2	
	<211> 78	
	<212> RNA	
20	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra NGF	
	<400> 2	
	gggaagccug uggagcugcc uacacuuuag uaugacaaac cuagagugua aaugcuucgc	60
	auugucacca acaacugg	78
25	<210> 3	
	<211> 79	
	<212> RNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
30	<223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra NGF	
	<400> 3	
	gggaagccug uggagcugca ggaugaaaaa aacccaaaau aaguagaaau gacagaaugg	60
	cauugucacc aacaacugg	79
	<210> 4	
	<211> 79	
35	<212> RNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra NGF	
	<400> 4	
40	gggaagccug uggagcugca ggaugaaaaa aacccaaaau ugacaaaua aacggcaacg	60
	cauugucacc aacaacugg	79
	<210> 5	
	<211> 79	

	<212> RNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra NGF	
5	<400> 5 gggaagccug uggagcugcu uaaacaagca agugaaaaa accacagcaa auguaaaaag cauugucacc aacaacugg	60 79
	<210> 6	
	<211> 79	
	<212> RNA	
10	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra NGF	
	<400> 6 gggaagccug uggagcugca ggaugaaaaa aacccaaaau uaaauaaaaa auagacggug cauugucacc aacaacugg	60 79
15	<210> 7	
	<211> 79	
	<212> RNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
20	<223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra NGF	
	<400> 7 gggaagccug uggagcugca ggaugaaaaa aacccaaaau uagauaaaaa auagacggug cauugucacc aacaacugg	60 79
	<210> 8	
	<211> 78	
25	<212> RNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra NGF	
	<400> 8 gggaagccug uggagcugcg gauaaaaau gaguuugaua aacaccugua uuaaaaccgc auugucacca acaacugg	60 78
30	<210> 9	
	<211> 79	
	<212> RNA	
	<213> Secuencia Artificial	
35	<220>	
	<223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra NGF	
	<400> 9 gggaagccug uggagcugcu ccacaaggau gaaaaaaacc caaauauau auuuauucag cauugucacc aacaacugg	60 79
40	<210> 10	
	<211> 79	
	<212> RNA	
	<213> Secuencia Artificial	

	<220>		
	<223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra NGF		
	<400> 10		
	gggaagccug uggagcugca ggaugaaaaa aacccaaaau aaagagcuug acaaaacaug	60	
	cauugucacc aacaacugg	79	
5	<210> 11		
	<211> 80		
	<212> RNA		
	<213> Secuencia Artificial		
	<220>		
10	<223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra NGF		
	<400> 11		
	gggaagccug uggagcugcu ccacaaggau gaaaaaaaac ccaauuaaua uauuuauca	60	
	gcauugucac caacaacugg	80	
	<210> 12		
	<211> 79		
15	<212> RNA		
	<213> Secuencia Artificial		
	<220>		
	<223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra NGF		
	<400> 12		
	gggaagccug uggagcugcg aaacagugaa acaaacacac gacugagaaa gcaguaacag	60	
20	cauugucacc aacaacugg	79	
	<210> 13		
	<211> 82		
	<212> RNA		
	<213> Secuencia Artificial		
25	<220>		
	<223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra NGF		
	<400> 13		
	gggaagccug uggagcugca ggaugaaaaa aacccaaaau uaaauaaaaa aaaauggacg	60	
	gugcauuguc accaacaacu gg	82	
	<210> 14		
30	<211> 77		
	<212> RNA		
	<213> Secuencia Artificial		
	<220>		
	<223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra NGF		
35	<400> 14		
	gggaagccug uggagcugcu gaauuggaua cagauaguug aaaaaaacca augaucagca	60	
	uugucaccaa caacugg	77	
	<210> 15		
	<211> 79		
	<212> RNA		
40	<213> Secuencia Artificial		
	<220>		
	<223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra NGF		

	<400> 15		
	gggaagccug uggagcugcu ccacaaggau gaaaaaaacc caaaauauau auuugaucag	60	
	cauugucacc aacaacugg	79	
	<210> 16		
	<211> 80		
5	<212> RNA		
	<213> Secuencia Artificial		
	<220>		
	<223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra NGF		
	<400> 16		
	gggaagccug uggagcugcu ccacaaggau gaaaaaaacc ccaaauaauug uauuuuauca	60	
10	gcauugucac caacaacugg	80	
	<210> 17		
	<211> 79		
	<212> RNA		
	<213> Secuencia Artificial		
15	<220>		
	<223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra NGF		
	<400> 17		
	gggaagccug uggagcugca ggauggaaaa aacccaaaau aaguagaaau gacagaaugg	60	
	cauugucacc aacaacugg	79	
	<210> 18		
20	<211> 80		
	<212> RNA		
	<213> Secuencia Artificial		
	<220>		
	<223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra NGF		
25	<400> 18		
	gggaagccug uggagcugcc gaauggacu guaaagcaug aaaaaaacca uucaaucgag	60	
	gcauugucac caacaacugg	80	
	<210> 19		
	<211> 80		
	<212> RNA		
30	<213> Secuencia Artificial		
	<220>		
	<223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra NGF		
	<400> 19		
	gggaagccug uggagcugca ggaugaaaaa aacccaaacu aaaguuuuuaa acugauacga	60	
	gcauugucac caacaacugg	80	
35	<210> 20		
	<211> 73		
	<212> RNA		
	<213> Secuencia Artificial		
	<220>		
40	<223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra NGF		
	<400> 20		
	gggaagccug uggagcugca ggaugaaaaa aacccaaaau aaaaacuugc cgagcauugu	60	
	caccaacaac ugg	73	

	<210> 21		
	<211> 80		
	<212> RNA		
	<213> Secuencia Artificial		
5	<220>		
	<223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra NGF		
	<400> 21		
	gggaagccug uggagcugca ggaugaaaa aaacccaaaa acaaagacaa cgauugagua	60	
	gcauugucac caacaacugg	80	
10	<210> 22		
	<211> 79		
	<212> RNA		
	<213> Secuencia Artificial		
	<220>		
	<223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra NGF		
15	<400> 22		
	gggaagccug uggagcugca ggaugaaaa aaacccaaa uguccacaga aaauggauug	60	
	cauugucacc aacaacugg	79	
	<210> 23		
	<211> 79		
	<212> RNA		
20	<213> Secuencia Artificial		
	<220>		
	<223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra NGF		
	<400> 23		
	gggaagccug uggagcugcg aaacagugaa acaaaccaca gacugagaaa gcaguaaaag	60	
	cauugucacc aacaacugg	79	
25	<210> 24		
	<211> 69		
	<212> RNA		
	<213> Secuencia Artificial		
	<220>		
30	<223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra NGF		
	<400> 24		
	gggaagccug uggagcugcc uacacuuuag uaugacaaac cuagagugua aaugcuucgc	60	
	auugucacc	69	
	<210> 25		
	<211> 47		
35	<212> RNA		
	<213> Secuencia Artificial		
	<220>		
	<223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra NGF		
	<400> 25		
40	ggagcugccu acacuuuagu augacaaacc uagaguguaa augcuuc	47	
	<210> 26		
	<211> 46		
	<212> RNA		
	<213> Secuencia Artificial		
45	<220>		
	<223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra NGF		

<400> 26
 gggcugugga gcugcuuaaa caagcaagug aaaaaaacca cagccc 46
 <210> 27
 <211> 45
 5 <212> RNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra NGF
 <400> 27
 10 gggaagccug uggagcugca ggaugaaaaa aacccaaaau uaaau 45
 <210> 28
 <211> 40
 <212> RNA
 <213> Secuencia Artificial
 15 <220>
 <223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra NGF
 <400> 28
 gggaagccug uggagcugca ggaugaaaaa aacccaaaau 40
 <210> 29
 20 <211> 61
 <212> RNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra NGF
 25 <400> 29
 gguggagcug cggauaaaaa uagaguuuga uaaacaccug uauuaaaacc gcauugucac 60
 c 61
 <210> 30
 <211> 41
 <212> RNA
 30 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra NGF
 <400> 30
 gggaugaaaaa uagaguuuga uaaacaccug uauuaaaacc c 41
 35 <210> 31
 <211> 34
 <212> RNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 40 <223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra NGF
 <400> 31
 gggagcugcu uaaacaagca agugaaaaa accc 34
 <210> 32
 <211> 38
 45 <212> RNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra NGF
 <400> 32
 50 uguggagcug cuuaacaag caagugaaaa aaaccaca 38

	<210> 33		
	<211> 36		
	<212> RNA		
	<213> Secuencia Artificial		
5	<220>		
	<223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra NGF		
	<400> 33		
	uguggagcug cuaaacagca agugaaaaaa accaca	36	
10	<210> 34		
	<211> 34		
	<212> RNA		
	<213> Secuencia Artificial		
	<220>		
	<223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra NGF		
15	<400> 34		
	guggagcugu uaaacaacaa gugaaaaaaa ccac	34	
	<210> 35		
	<211> 38		
	<212> RNA		
20	<213> Secuencia Artificial		
	<220>		
	<223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra NGF		
	<400> 35		
	gggaagccug uggagcugca ggaugaaaaa aacccaaa	38	
25	<210> 36		
	<211> 35		
	<212> RNA		
	<213> Secuencia Artificial		
	<220>		
30	<223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra NGF		
	<400> 36		
	gggaagccug uggagcugca ggaugaaaaa aacccc	35	
	<210> 37		
	<211> 74		
35	<212> RNA		
	<213> Secuencia Artificial		
	<220>		
	<223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra NGF		
	<400> 37		
	gggagaacuu cgaccagaag uuugaaagaa acccaaaggu gaaacaacaa uaugugcgca	60	
40	uacauggauc cuca	74	
	<210> 38		
	<211> 74		
	<212> RNA		
	<213> Secuencia Artificial		
45	<220>		
	<223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra NGF		
	<400> 38		
	gggagaacuu cgaccagaag agaaugaaac uccacaaagu acauaaaaca uaugugcgca	60	
	uacauggauc cuca	74	

	<210> 39		
	<211> 74		
	<212> RNA		
	<213> Secuencia Artificial		
5	<220>		
	<223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra NGF		
	<400> 39		
	gggagaacuu cgaccagaag ugugaaaaga acccaauaa aacaacaug uaugugcgca	60	
	uacauggauc cuca	74	
10	<210> 40		
	<211> 74		
	<212> RNA		
	<213> Secuencia Artificial		
	<220>		
	<223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra NGF		
15	<400> 40		
	gggagaacuu cgaccagaag uuugaaaaaa acccaggaaa auggaagacg uaugugcgca	60	
	uacauggauc cuca	74	
20	<210> 41		
	<211> 74		
	<212> RNA		
	<213> Secuencia Artificial		
	<220>		
	<223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra NGF		
	<400> 41		
	gggagaacuu cgaccagaag uuugaaagga acccaaagcg aaacaaaacg uaugugcgca	60	
	uacauggauc cuca	74	
25	<210> 42		
	<211> 74		
	<212> RNA		
	<213> Secuencia Artificial		
	<220>		
30	<223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra NGF		
	<400> 42		
	gggagaacuu cgaccagaag uuugaaaaaa acccaaaaga gcagcagaga uaugugcgca	60	
	uacauggauc cuca	74	
35	<210> 43		
	<211> 73		
	<212> RNA		
	<213> Secuencia Artificial		
	<220>		
	<223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra NGF		
	<400> 43		
	gggagaacuu cgaccagaag cuugaaaaaa ccccaauaug agaaucauau augugcgcau	60	
40	acauggaucc uca	73	
	<210> 44		
	<211> 73		
	<212> RNA		
	<213> Secuencia Artificial		

	<220>		
	<223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra NGF		
	<400> 44		
	ggggaacuuu gaccagaagu uugaaagaaa cccaaaaua gcaccuaau augugcgcau	60	
	acauggaucc uca	73	
5	<210> 45		
	<211> 74		
	<212> RNA		
	<213> Secuencia Artificial		
	<220>		
10	<223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra NGF		
	<400> 45		
	gggagaacuu cgaccagaag agaaugaaac ucccuaauca aggacauga uaugugcgca	60	
	uacauggauc cuca	74	
	<210> 46		
	<211> 74		
15	<212> RNA		
	<213> Secuencia Artificial		
	<220>		
	<223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra NGF		
	<400> 46		
	gggagaacuu cgaccagaag uuugaaaca acccaaguu acgcacaaa uaugugcgca	60	
20	uacauggauc cuca	74	
	<210> 47		
	<211> 74		
	<212> RNA		
	<213> Secuencia Artificial		
25	<220>		
	<223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra NGF		
	<400> 47		
	gggagaacuu cgaccagaag aaguugaaa agaaccaaa augagcaaaa uaugugcgca	60	
	uacauggauc cuca	74	
	<210> 48		
30	<211> 74		
	<212> RNA		
	<213> Secuencia Artificial		
	<220>		
	<223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra NGF		
35	<400> 48		
	gggagaacuu cgaccagaag uuugaaaaga acccgaaaa cgcauaauaa uaugugcgca	60	
	uacauggauc cuca	74	
	<210> 49		
	<211> 74		
	<212> RNA		
40	<213> Secuencia Artificial		
	<220>		
	<223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra NGF		

	<400> 49		
	gggagaacuu cgaccagaag ugaaagaaac ucccaagacg guaacgaaag uaugugcgca	60	
	uacauggauc cuca	74	
	<210> 50		
	<211> 74		
5	<212> RNA		
	<213> Secuencia Artificial		
	<220>		
	<223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra NGF		
	<400> 50		
	gggagaacuu cgaccagaag ugaaaaaac ucccaauaca aacacaaaaa uaugugcgca	60	
10	uacauggauc cuca	74	
	<210> 51		
	<211> 77		
	<212> RNA		
	<213> Secuencia Artificial		
15	<220>		
	<223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra NGF		
	<400> 51		
	gggagaacuu cgaccagaag uuugaaagaa acccaaaaaa acaacauaug aacuaugugc	60	
	gcuaucaugg auccuca	77	
	<210> 52		
20	<211> 73		
	<212> RNA		
	<213> Secuencia Artificial		
	<220>		
	<223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra NGF		
25	<400> 52		
	gggagaacuu cgaccagaag uuugaaagaa acccaauau acaaaacacu augugcgcau	60	
	acauggaucc uca	73	
	<210> 53		
	<211> 74		
	<212> RNA		
30	<213> Secuencia Artificial		
	<220>		
	<223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra NGF		
	<400> 53		
	gggagaacuu cgaccagaag uuugaaagga acccaaaaac acaaaauguc uaugugcgca	60	
	uacauggauc cuca	74	
35	<210> 54		
	<211> 74		
	<212> RNA		
	<213> Secuencia Artificial		
	<220>		
40	<223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra NGF		
	<400> 54		
	gggagaacuu cgaccagaag ucgaaaguga aagaacucc aacgaaagca uaugugcgca	60	
	uacauggauc cuca	74	

	<210> 55		
	<211> 72		
	<212> RNA		
	<213> Secuencia Artificial		
5	<220>		
	<223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra NGF		
	<400> 55		
	gggagaacuu cgaccagaag uuugaaagaa acccaaaaau gaaugcaacu augugcgcau	60	
	acauggaccu ca	72	
10	<210> 56		
	<211> 74		
	<212> RNA		
	<213> Secuencia Artificial		
	<220>		
	<223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra NGF		
15	<400> 56		
	gggagaacuu cgaccagaag ugaaagaaac ucccaacaca aaugcacaac uaugugcgca	60	
	uacauggauc cuca	74	
20	<210> 57		
	<211> 75		
	<212> RNA		
	<213> Secuencia Artificial		
	<220>		
	<223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra NGF		
	<400> 57		
	gggagaacuu cgaccagaag uuugaaaaaa acccaaacac cgaagcaca auaugugcgc	60	
	auacauggau ccuca	75	
25	<210> 58		
	<211> 74		
	<212> RNA		
	<213> Secuencia Artificial		
	<220>		
30	<223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra NGF		
	<400> 58		
	gggagaacuu cgaccagaag uuugaaaaga acccaauac agaauaaaug uaugugcgca	60	
	uacauggauc cuca	74	
35	<210> 59		
	<211> 74		
	<212> RNA		
	<213> Secuencia Artificial		
	<220>		
	<223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra NGF		
	<400> 59		
40	gggagaacuu cgaccagaag ucgaaacguu ugaaaaaaac ccaaggagga uaugugcgca	60	
	uacauggauc cuca	74	
45	<210> 60		
	<211> 74		
	<212> RNA		
	<213> Secuencia Artificial		

	<220>		
	<223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra NGF		
	<400> 60		
	gggagaacuu cgaccagagg auuugaaaaa aacccgaaua aagauaacag uaugugcgca	60	
	uacauuggauc cuca		74
5	<210> 61		
	<211> 74		
	<212> RNA		
	<213> Secuencia Artificial		
	<220>		
10	<223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra NGF		
	<400> 61		
	gggagaacuu cgaccagaag gucguaacga auaaaacucc ugcacaaaaa uaugugcgca	60	
	uacauuggauc cuca		74
	<210> 62		
	<211> 74		
15	<212> RNA		
	<213> Secuencia Artificial		
	<220>		
	<223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra NGF		
	<400> 62		
	gggagaacuu cgaccagaag uuugaaagaa acccaauua aagugaacag uaugugcgca	60	
20	uacauuggauc cuca		74
	<210> 63		
	<211> 74		
	<212> RNA		
	<213> Secuencia Artificial		
25	<220>		
	<223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra NGF		
	<400> 63		
	gggagaacuu cgaccagaag auuugaaaga aacccaaacu aagcacaaaa uaugugcgca	60	
	uacauuggauc cuca		74
	<210> 64		
	<211> 74		
30	<212> RNA		
	<213> Secuencia Artificial		
	<220>		
	<223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra NGF		
35	<400> 64		
	gggagaacuu cgaccagaag uuugaaagaa acccaaaaca uuagcacaca uaugugcgca	60	
	uacauuggauc cuca		74
	<210> 65		
	<211> 74		
	<212> RNA		
40	<213> Secuencia Artificial		
	<220>		
	<223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra NGF		

	<400> 65		
	gggagaacuu cgaccagaag ugugaaaaaa acccaaaucg agcacaaaau uaugugcgca	60	
	uacauggauc cuca	74	
	<210> 66		
	<211> 74		
5	<212> RNA		
	<213> Secuencia Artificial		
	<220>		
	<223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra NGF		
	<400> 66		
	gggagaacuu cgaccagaag uuugaaaaaa acccaaagca agcacacaau uaugugcgca	60	
10	uacauggauc cuca	74	
	<210> 67		
	<211> 74		
	<212> RNA		
	<213> Secuencia Artificial		
15	<220>		
	<223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra NGF		
	<400> 67		
	gggagaacuu cgaccagaag ucgaauacga acaaaacucc caaaggaaua uaugugcgca	60	
	uacauggauc cuca	74	
	<210> 68		
20	<211> 74		
	<212> RNA		
	<213> Secuencia Artificial		
	<220>		
	<223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra NGF		
25	<400> 68		
	gggagaacuu cgaccagaag ucgagagcga aagaacucc caaaacacag uaugugcgca	60	
	uacauggauc cuca	74	
	<210> 69		
	<211> 83		
	<212> DNA		
30	<213> Secuencia Artificial		
	<220>		
	<223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra NGF		
	<220>		
	<221> característica_misc		
35	<223> molécula de unión a DNA/RNA		
	<400> 69		
	gggagaggca agaatagggc ccagctgaaa aaaacctgga cgtacaccgt tcgccgagcg	60	
	ggtgaagaga agagacatta gga	83	
	<210> 70		
	<211> 82		
40	<212> DNA		
	<213> Secuencia Artificial		
	<220>		
	<223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra NGF		

<220>
 <221> característica_misc
 <223> molécula de unión a DNA/RNA

 <400> 70
 gggagaggca agaatagggc tggaaataga accgcgctgt cttcattaag ccgccaacg 60
 5 gtgaagagaa gagacattag ga 82

 <210> 71
 <211> 82
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

 10 <220>
 <223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra NGF

 <220>
 <221> característica_misc
 <223> molécula de unión a DNA/RNA

 15 <400> 71
 gggagaggca agaatagggc acttgaaaaa aacccaaatt taccgtcttc agcgtcgggt 60
 gtgaagagaa gagacattag ga 82

 <210> 72
 <211> 82
 <212> DNA
 20 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra NGF

 <220>
 <221> característica_misc
 25 <223> molécula de unión a DNA/RNA

 <400> 72
 gggagaggca agaatagggc tggatgggca gtaacctgaa aaaaaccacc cacctctacc 60
 gtgaagagaa gagacattag ga 82

 <210> 73
 <211> 81
 30 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra NGF

 <220>
 <221> característica_misc
 35 <223> molécula de unión a DNA/RNA

 <400> 73
 gggagaggca agaatagggc acttgaaaaa aacccaaaga aagaatactt acccggcgcg 60
 tgaagagaag agacattagg a 81

 <210> 74
 40 <211> 82
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra NGF

<220>		
<221> característica_misc		
<223> molécula de unión a DNA/RNA		
<400> 74		
	gggagaggca agaataagggc atagtgtaga cccctctcaa gataccccat gaattgcccc	60
5	gtgaagagaa gagacattag ga	82
<210> 75		
<211> 78		
<212> RNA		
<213> Secuencia Artificial		
<220>		
10	<223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra NGF	
<400> 75		
	gggagaacuu cgaccagaag ugaaagaauc uccaaagaca agauaaaaac aaccguaugu	60
	gcgcgauacau ggauccuc	78
<210> 76		
15	<211> 78	
<212> RNA		
<213> Secuencia Artificial		
<220>		
<223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra NGF		
<400> 76		
20	gggagaacuu cgaccagaag gauaaaacgca uguauuugca guauuuuuuu ugccuuauugu	60
	gcgcgauacau ggauccuc	78
<210> 77		
<211> 78		
<212> RNA		
25	<213> Secuencia Artificial	
<220>		
<223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra NGF		
<400> 77		
	gggagaacuu cgaccagaag ugaaaaaauc uccaguugca agacgaaaca aaccuuauugu	60
	gcgcgauacau ggauccuc	78
<210> 78		
30	<211> 78	
<212> DNA		
<213> Secuencia Artificial		
<220>		
35	<223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra NGF	
<400> 78		
	gggagaacuu cgaccagaag uguguauugu ucagggugug cccagccuau aaccuuauugu	60
	gcgcgauacau ggauccuc	78
<210> 79		
<211> 78		
40	<212> RNA	
<213> Secuencia Artificial		
<220>		
<223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra NGF		

	<400> 79		
	gggagaacuu cgaccagaag gauagccaug uggaggugaa gacugaaaau aaccuauugu	60	
	gcgcgauacau ggauccuc	78	
	<210> 80		
	<211> 78		
5	<212> RNA		
	<213> Secuencia Artificial		
	<220>		
	<223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra NGF		
	<400> 80		
	gggagaacuu cgaccagaag ugaaaacaac cucccaauaa ugaucacaga aauccuauugu	60	
10	gcgcgauacau ggauccuc	78	
	<210> 81		
	<211> 78		
	<212> RNA		
	<213> Secuencia Artificial		
15	<220>		
	<223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra NGF		
	<400> 81		
	gggagaacuu cgaccagaag gagaugacug uguaaaccaca gaaugaaaau aacucuaugu	60	
	gcgcgauacau ggauccuc	78	
	<210> 82		
20	<211> 78		
	<212> RNA		
	<213> Secuencia Artificial		
	<220>		
	<223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra NGF		
25	<400> 82		
	gggagaacuu cgaccagaag aggaugcuug uuugguuaca agcugaaaga aaccuuauugu	60	
	gcgcgauacau ggauccuc	78	
	<210> 83		
	<211> 79		
	<212> RNA		
30	<213> Secuencia Artificial		
	<220>		
	<223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra NGF		
	<400> 83		
	gggagaacuu cgaccagaag uugaagcuug aaaaaaaccc aggauuuaac agacaguaug	60	
	ugcgcauaca uggauccuc	79	
	<210> 84		
35	<211> 78		
	<212> RNA		
	<213> Secuencia Artificial		
	<220>		
40	<223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra NGF		
	<400> 84		
	gggagaacuu cgaccagaag ugaaagaaac ucccgaugaa agauguuaca aaccuauugu	60	
	gcgcgauacau ggauccuc	78	

	<210> 85		
	<211> 78		
	<212> RNA		
	<213> Secuencia Artificial		
5	<220>		
	<223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra NGF		
	<400> 85		
	gggagaacuu cgaccagaag cggaagccug cguaaccgca ggaugaaaac aaccguaugu	60	
	gcgcuaacau ggauccuc	78	
10	<210> 86		
	<211> 78		
	<212> RNA		
	<213> Secuencia Artificial		
	<220>		
	<223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra NGF		
15	<400> 86		
	gggagaacuu cgaccagaag gaguagccag ugaaccugga auaugaaaaa aaccuuauugu	60	
	gcgcuaacau ggauccuc	78	
20	<210> 87		
	<211> 71		
	<212> DNA		
	<213> Secuencia Artificial		
	<220>		
	<223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra NGF		
25	<400> 87		
	gggatcgaca gggctgcagc actggcgtag gttggaatat gggatattttt gtgggccgag	60	
	tcgtgccatc t	71	
30	<210> 88		
	<211> 33		
	<212> RNA		
	<213> Secuencia Artificial		
	<220>		
	<223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra NGF		
	<400> 88		
	gggaagccgu ggagcugcgg augaaaaaaa ccc	33	
35	<210> 89		
	<211> 34		
	<212> RNA		
	<213> Secuencia Artificial		
	<220>		
40	<223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra NGF		
	<400> 89		
	gggaagccug uaaacagcag gaugaaaaaa accc	34	
45	<210> 90		
	<211> 32		
	<212> RNA		
	<213> Secuencia Artificial		
	<220>		
	<223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra NGF		

<400> 90
 gggagccugu aaacagcagg ugaaaaaac cc 32

 <210> 91
 <211> 11
 5 <212> RNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> secuencia consenso

 <400> 91
 10 ugaaaaaac c 11

 <210> 92
 <211> 11
 <212> RNA
 <213> Artificial

 15 <220>
 <223> secuencia consenso

 <400> 92
 ugaaagaaac c 11

 <210> 93
 20 <211> 11
 <212> RNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> secuencia consenso

 25 <400> 93
 ugaaagaaac u 11

 <210> 94
 <211> 11
 <212> RNA
 30 <213> Artificial

 <220>
 <223> secuencia consenso

 <400> 94
 ugaaacaaac c 11

 35 <210> 95
 <211> 11
 <212> RNA
 <213> Artificial

 <220>
 40 <223> secuencia consenso

 <400> 95
 ugaaaagaac c 11

 <210> 96
 <211> 11
 45 <212> RNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> secuencia consenso

 <400> 96
 50 ugaaaaaacc c 11

<210> 97
 <211> 11
 <212> RNA
 <213> Artificial
 5 <220>
 <223> secuencia consenso
 <400> 97
 ugaaaaaacc u 11
 10 <210> 98
 <211> 11
 <212> RNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> secuencia consenso
 15 <400> 98
 ugaaaacaac c 11
 <210> 99
 <211> 11
 <212> RNA
 20 <213> Artificial
 <220>
 <223> secuencia consenso
 <400> 99
 ugaaauaac c 11
 25 <210> 100
 <211> 11
 <212> RNA
 <213> Artificial
 <220>
 30 <223> secuencia consenso
 <400> 100
 ugaaauaac u 11
 <210> 101
 <211> 11
 35 <212> RNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> secuencia consenso
 <400> 101
 40 ugaaaaaac u 11
 <210> 102
 <211> 11
 <212> RNA
 <213> Artificial
 45 <220>
 <223> secuencia consenso
 <400> 102
 agaaugaaac u 11
 <210> 103
 50 <211> 11

<212> RNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> secuencia consenso

 5 <400> 103
 cgaacaaaac u 11

 <210> 104
 <211> 11
 10 <212> RNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> secuencia consenso

 <400> 104
 cgaaagaaac u 11

 15 <210> 105
 <211> 11
 <212> RNA
 <213> Artificial

 <220>
 20 <223> secuencia consenso

 <400> 105
 ugaaaggaac c 11

 <210> 106
 <211> 11
 25 <212> RNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> secuencia consenso

 <220>
 30 <221> variación
 <222> 5
 <223> /reemplazar="c" /reemplazar="g" /reemplazar="u"

 <220>
 <221> variación
 35 <222> 6
 <223> /reemplazar="c" /reemplazar="g" /reemplazar="u"

 <220>
 <221> variación
 <222> 7
 40 <223> /reemplazar="c" /reemplazar="g" /reemplazar="u"

 <220>
 <221> variación
 <222> 9
 <223> /reemplazar="c" /reemplazar="g" /reemplazar="u"

 45 <220>
 <221> variación
 <222> 11
 <223> /reemplazar="u" /reemplazar="c"

 <400> 106
 50 hgaaaaaac t 11

 <210> 107
 <211> 11

<212> RNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> secuencia consenso
 5 <220>
 <221> variación
 <222> 6
 <223> /reemplazar="c" /reemplazar="g" /reemplazar="u"
 <220>
 10 <221> variación
 <222> 7
 <223> /reemplazar="c" /reemplazar="g" /reemplazar="u"
 <220>
 15 <221> variación
 <222> 9
 <223> /reemplazar="c" /reemplazar="g" /reemplazar="u"
 <220>
 20 <221> variación
 <222> 11
 <223> /reemplazar="u" /reemplazar="c"
 <400> 107
 ugaaaaaaac t 11
 <210> 108
 <211> 11
 25 <212> RNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> secuencia consenso
 <220>
 30 <221> variación
 <222> 5
 <223> /reemplazar="c" /reemplazar="g" /reemplazar="u"
 <220>
 35 <221> variación
 <222> 6
 <223> /reemplazar="c" /reemplazar="g" /reemplazar="u"
 <220>
 40 <221> variación
 <222> 11
 <223> /reemplazar="u" /reemplazar="c"
 <400> 108
 cgaaaaaac t 11
 <210> 109
 <211> 11
 45 <212> RNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> secuencia consenso
 <220>
 50 <221> variación
 <222> 5
 <223> /reemplazar="c" /reemplazar="g" /reemplazar="u"

<220>
 <221> variación
 <222> 6
 <223> /reemplazar="c" /reemplazar="g" /reemplazar="u"

5 <220>
 <221> variación
 <222> 11
 <223> /reemplazar="u" /reemplazar="c"

10 <400> 109
 agaaaaaac t 11
 <210> 110
 <211> 11
 <212> RNA
 <213> Artificial

15 <220>
 <223> secuencia consenso

20 <220>
 <221> variación
 <222> 11
 <223> /reemplazar="u" /reemplazar="c"

25 <400> 110
 ugaaaaaaac t 11
 <210> 111
 <211> 11
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> secuencia consenso

30 <220>
 <221> variación
 <222> 11
 <223> /reemplazar="u" /reemplazar="c"

<400> 111
 ugaagaaac t 11

35 <210> 112
 <211> 11
 <212> RNA
 <213> Artificial

40 <220>
 <223> secuencia consenso

<220>
 <221> variación
 <222> 11
 <223> /reemplazar="u" /reemplazar="c"

45 <400> 112
 cgaacaaaac t 11
 <210> 113
 <211> 11
 <212> RNA

50 <213> Artificial

<220>
 <223> secuencia consenso

<220>
 <221> variación
 <222> 11
 <223> /reemplazar="u" /reemplazar="c"
 5 <400> 113
 cgaaagaaac t 11
 <210> 114
 <211> 79
 <212> DNA
 10 <213> Artificial
 <220>
 <223> DNA molde
 <220>
 <221> variación
 15 <222> 21
 <223> /reemplazar="c" /reemplazar="g" /reemplazar="t"
 <220>
 <221> variación
 <222> 22
 20 <223> /reemplazar="c" /reemplazar="g" /reemplazar="t"
 <220>
 <221> variación
 <222> 23
 <223> /reemplazar="c" /reemplazar="g" /reemplazar="t"
 25 <220>
 <221> variación
 <222> 24
 <223> /reemplazar="c" /reemplazar="g" /reemplazar="t"
 <220>
 30 <221> variación
 <222> 25
 <223> /reemplazar="c" /reemplazar="g" /reemplazar="t"
 <220>
 35 <221> variación
 <222> 26
 <223> /reemplazar="c" /reemplazar="g" /reemplazar="t"
 <220>
 <221> variación
 <222> 27
 40 <223> /reemplazar="c" /reemplazar="g" /reemplazar="t"
 <220>
 <221> variación
 <222> 28
 <223> /reemplazar="c" /reemplazar="g" /reemplazar="t"
 45 <220>
 <221> variación
 <222> 29
 <223> /reemplazar="c" /reemplazar="g" /reemplazar="t"
 <220>
 50 <221> variación
 <222> 30
 <223> /reemplazar="c" /reemplazar="g" /reemplazar="t"
 <220>
 <221> variación

<222> 31
 <223> /reemplazar="c" /reemplazar="g" /reemplazar="t"

 <220>
 <221> variación
 5 <222> 32
 <223> /reemplazar="c" /reemplazar="g" /reemplazar="t"

 <220>
 <221> variación
 <222> 33
 10 <223> /reemplazar="c" /reemplazar="g" /reemplazar="t"

 <220>
 <221> variación
 <222> 34
 <223> /reemplazar="c" /reemplazar="g" /reemplazar="t"

 15 <220>
 <221> variación
 <222> 35
 <223> /reemplazar="c" /reemplazar="g" /reemplazar="t"

 <220>
 20 <221> variación
 <222> 36
 <223> /reemplazar="c" /reemplazar="g" /reemplazar="t"

 <220>
 <221> variación
 25 <222> 37
 <223> /reemplazar="c" /reemplazar="g" /reemplazar="t"

 <220>
 <221> variación
 <222> 38
 30 <223> /reemplazar="c" /reemplazar="g" /reemplazar="t"

 <220>
 <221> variación
 <222> 39
 <223> /reemplazar="c" /reemplazar="g" /reemplazar="t"

 35 <220>
 <221> variación
 <222> 40
 <223> /reemplazar="c" /reemplazar="g" /reemplazar="t"

 <220>
 40 <221> variación
 <222> 41
 <223> /reemplazar="c" /reemplazar="g" /reemplazar="t"

 <220>
 <221> variación
 45 <222> 42
 <223> /reemplazar="c" /reemplazar="g" /reemplazar="t"

 <220>
 <221> variación
 <222> 43
 50 <223> /reemplazar="c" /reemplazar="g" /reemplazar="t"

 <220>
 <221> variación
 <222> 44
 <223> /reemplazar="c" /reemplazar="g" /reemplazar="t"

<220>
 <221> variación
 <222> 45
 <223> /reemplazar="c" /reemplazar="g" /reemplazar="t"

5

<220>
 <221> variación
 <222> 46
 <223> /reemplazar="c" /reemplazar="g" /reemplazar="t"

10

<220>
 <221> variación
 <222> 47
 <223> /reemplazar="c" /reemplazar="g" /reemplazar="t"

15

<220>
 <221> variación
 <222> 48
 <223> /reemplazar="c" /reemplazar="g" /reemplazar="t"

20

<220>
 <221> variación
 <222> 49
 <223> /reemplazar="c" /reemplazar="g" /reemplazar="t"

25

<220>
 <221> variación
 <222> 50
 <223> /reemplazar="c" /reemplazar="g" /reemplazar="t"

30

<220>
 <221> variación
 <222> 51
 <223> /reemplazar="c" /reemplazar="g" /reemplazar="t"

35

<220>
 <221> variación
 <222> 52
 <223> /reemplazar="c" /reemplazar="g" /reemplazar="t"

40

<220>
 <221> variación
 <222> 53
 <223> /reemplazar="c" /reemplazar="g" /reemplazar="t"

45

<220>
 <221> variación
 <222> 54
 <223> /reemplazar="c" /reemplazar="g" /reemplazar="t"

50

<220>
 <221> variación
 <222> 55
 <223> /reemplazar="c" /reemplazar="g" /reemplazar="t"

<220>
 <221> variación
 <222> 56
 <223> /reemplazar="c" /reemplazar="g" /reemplazar="t"

<220>
 <221> variación
 <222> 57
 <223> /reemplazar="c" /reemplazar="g" /reemplazar="t"

<220>
 <221> variación

<222> 58
 <223> /reemplazar="c" /reemplazar="g" /reemplazar="t"

 <220>
 <221> variación
 5 <222> 59
 <223> /reemplazar="c" /reemplazar="g" /reemplazar="t"

 <220>
 <221> variación
 <222> 60
 10 <223> /reemplazar="c" /reemplazar="g" /reemplazar="t"

 <400> 114
 ccagtgtgtg gtgacaatgc aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 60
 gcagctccac aggcttccc 79

 <210> 115
 <211> 36
 15 <212> DNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> cebador

 <400> 115
 20 taatacgact cactataggg aagcctgtgg agctgc 36

 <210> 116
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial

 25 <220>
 <223> cebador

 <400> 116
 ccagtgtgtg gtgacaatgc 20

 30 <210> 117
 <211> 74
 <212> DNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> DNA molde

 35 <220>
 <221> variación
 <222> 25
 <223> /reemplazar="c" /reemplazar="g" /reemplazar="t"

 <220>
 40 <221> variación
 <222> 26
 <223> /reemplazar="c" /reemplazar="g" /reemplazar="t"

 <220>
 <221> variación
 45 <222> 27
 <223> /reemplazar="c" /reemplazar="g" /reemplazar="t"

 <220>
 <221> variación
 <222> 28
 50 <223> /reemplazar="c" /reemplazar="g" /reemplazar="t"

<220>
 <221> variación
 <222> 29
 <223> /reemplazar="c" /reemplazar="g" /reemplazar="t"

5 <220>
 <221> variación
 <222> 30
 <223> /reemplazar="c" /reemplazar="g" /reemplazar="t"

10 <220>
 <221> variación
 <222> 31
 <223> /reemplazar="c" /reemplazar="g" /reemplazar="t"

15 <220>
 <221> variación
 <222> 32
 <223> /reemplazar="c" /reemplazar="g" /reemplazar="t"

20 <220>
 <221> variación
 <222> 33
 <223> /reemplazar="c" /reemplazar="g" /reemplazar="t"

 <220>
 <221> variación
 <222> 34
 <223> /reemplazar="c" /reemplazar="g" /reemplazar="t"

25 <220>
 <221> variación
 <222> 35
 <223> /reemplazar="c" /reemplazar="g" /reemplazar="t"

30 <220>
 <221> variación
 <222> 36
 <223> /reemplazar="c" /reemplazar="g" /reemplazar="t"

35 <220>
 <221> variación
 <222> 37
 <223> /reemplazar="c" /reemplazar="g" /reemplazar="t"

40 <220>
 <221> variación
 <222> 38
 <223> /reemplazar="c" /reemplazar="g" /reemplazar="t"

 <220>
 <221> variación
 <222> 39
 <223> /reemplazar="c" /reemplazar="g" /reemplazar="t"

45 <220>
 <221> variación
 <222> 40
 <223> /reemplazar="c" /reemplazar="g" /reemplazar="t"

50 <220>
 <221> variación
 <222> 41
 <223> /reemplazar="c" /reemplazar="g" /reemplazar="t"

 <220>
 <221> variación

<222> 42
 <223> /reemplazar="c" /reemplazar="g" /reemplazar="t"

 <220>
 <221> variación
 5 <222> 43
 <223> /reemplazar="c" /reemplazar="g" /reemplazar="t"

 <220>
 <221> variación
 <222> 44
 10 <223> /reemplazar="c" /reemplazar="g" /reemplazar="t"

 <220>
 <221> variación
 <222> 45
 <223> /reemplazar="c" /reemplazar="g" /reemplazar="t"

 15 <220>
 <221> variación
 <222> 46
 <223> /reemplazar="c" /reemplazar="g" /reemplazar="t"

 <220>
 20 <221> variación
 <222> 47
 <223> /reemplazar="c" /reemplazar="g" /reemplazar="t"

 <220>
 <221> variación
 25 <222> 48
 <223> /reemplazar="c" /reemplazar="g" /reemplazar="t"

 <220>
 <221> variación
 <222> 49
 30 <223> /reemplazar="c" /reemplazar="g" /reemplazar="t"

 <220>
 <221> variación
 <222> 50
 <223> /reemplazar="c" /reemplazar="g" /reemplazar="t"

 35 <220>
 <221> variación
 <222> 51
 <223> /reemplazar="c" /reemplazar="g" /reemplazar="t"

 <220>
 40 <221> variación
 <222> 52
 <223> /reemplazar="c" /repiace="g" /reemplazar="t"

 <220>
 <221> variación
 45 <222> 53
 <223> /reemplazar="c" /reemplazar="g" /reemplazar="t"

 <220>
 <221> variación
 <222> 54
 50 <223> /reemplazar="c" /reemplazar="g" /reemplazar="t"

 <400> 117
 tgaggatcca tgtatgcgca cataaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaacttctg 60
 gtcgaagtcc tccc 74

<210> 118
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> Artificial
 5 <220>
 <223> cebador
 <400> 118
 cggaattcta atacgactca ctataggag aactcgacc agaag 45
 <210> 119
 10 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador
 15 <400> 119
 tgaggatcca tgtatcgca cata 24
 <210> 120
 <211> 82
 <212> DNA
 20 <213> Artificial
 <220>
 <223> DNA molde
 <220>
 <221> variación
 25 <222> 23
 <223> /reemplazar="c" /reemplazar="g" /reemplazar="t"
 <220>
 <221> variación
 <222> 24
 30 <223> /reemplazar="c" /reemplazar="g" /reemplazar="t"
 <220>
 <221> variación
 <222> 25
 <223> /reemplazar="c" /reemplazar="g" /reemplazar="t"
 35 <220>
 <221> variación
 <222> 26
 <223> /reemplazar="c" /reemplazar="g" /reemplazar="t"
 <220>
 40 <221> variación
 <222> 27
 <223> /reemplazar="c" /reemplazar="g" /reemplazar="t"
 <220>
 <221> variación
 45 <222> 28
 <223> /reemplazar="c" /reemplazar="g" /reemplazar="t"
 <220>
 <221> variación
 <222> 29
 50 <223> /reemplazar="c" /reemplazar="g" /reemplazar="t"
 <220>
 <221> variación
 <222> 30
 <223> /reemplazar="c" /reemplazar="g" /reemplazar="t"

	<220>
	<221> variación
	<222> 31
	<223> /reemplazar="c" /reemplazar="g" /reemplazar="t"
5	<220>
	<221> variación
	<222> 32
	<223> /reemplazar="c" /reemplazar="g" /reemplazar="t"
10	<220>
	<221> variación
	<222> 33
	<223> /reemplazar="c" /reemplazar="g" /reemplazar="t"
15	<220>
	<221> variación
	<222> 34
	<223> /reemplazar="c" /reemplazar="g" /reemplazar="t"
20	<220>
	<221> variación
	<222> 35
	<223> /reemplazar="c" /reemplazar="g" /reemplazar="t"
25	<220>
	<221> variación
	<222> 37
	<223> /reemplazar="c" /reemplazar="g" /reemplazar="t"
30	<220>
	<221> variación
	<222> 38
	<223> /reemplazar="c" /reemplazar="g" /reemplazar="t"
35	<220>
	<221> variación
	<222> 39
	<223> /reemplazar="c" /reemplazar="g" /reemplazar="t"
40	<220>
	<221> variación
	<222> 40
	<223> /reemplazar="c" /reemplazar="g" /reemplazar="t"
45	<220>
	<221> variación
	<222> 42
	<223> /reemplazar="c" /reemplazar="g" /reemplazar="t"
50	<220>
	<221> variación
	<222> 43
	<223> /reemplazar="c" /reemplazar="g" /reemplazar="t"
	<220>
	<221> variación

<222> 44
 <223> /reemplazar="c" /reemplazar="g" /reemplazar="t"

 <220>
 <221> variación
 5 <222> 45
 <223> /reemplazar="c" /reemplazar="g" /reemplazar="t"

 <220>
 <221> variación
 <222> 46
 10 <223> /reemplazar="c" /reemplazar="g" /reemplazar="t"

 <220>
 <221> variación
 <222> 47
 <223> /reemplazar="c" /reemplazar="g" /reemplazar="t"

 15 <220>
 <221> variación
 <222> 48
 <223> /reemplazar="c" /reemplazar="g" /reemplazar="t"

 <220>
 20 <221> variación
 <222> 49
 <223> /reemplazar="c" /reemplazar="g" /reemplazar="t"

 <220>
 <221> variación
 25 <222> 50
 <223> /reemplazar="c" /reemplazar="g" /reemplazar="t"

 <220>
 <221> variación
 <222> 51
 30 <223> /reemplazar="c" /reemplazar="g" /reemplazar="t"

 <220>
 <221> variación
 <222> 52
 <223> /reemplazar="c" /reemplazar="g" /reemplazar="t"

 35 <220>
 <221> variación
 <222> 53
 <223> /reemplazar="c" /reemplazar="g" /reemplazar="t"

 <220>
 40 <221> variación
 <222> 54
 <223> /reemplazar="c" /reemplazar="g" /reemplazar="t"

 <220>
 <221> variación
 45 <222> 55
 <223> /reemplazar="c" /reemplazar="g" /reemplazar="t"

 <220>
 <221> variación
 <222> 56
 50 <223> /reemplazar="c" /reemplazar="g" /reemplazar="t"

 <220>
 <221> variación
 <222> 57
 <223> /reemplazar="c" /reemplazar="g" /reemplazar="t"

<220>
 <221> variación
 <222> 58
 <223> /reemplazar="c" /reemplazar="g" /repl ace="t"

5 <220>
 <221> variación
 <222> 59
 <223> /reemplazar="c" /reemplazar="g" /reemplazar="t"

10 <220>
 <221> variación
 <222> 60
 <223> /reemplazar="c" /reemplazar="g" /reemplazar="t"

15 <220>
 <221> variación
 <222> 61
 <223> /reemplazar="c" /reemplazar="g" /reemplazar="t"

20 <220>
 <221> variación
 <222> 62
 <223> /reemplazar="c" /reemplazar="g" /repl ace="t"

<400> 120
 tcctaattgctc tcttctcttc acaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 60
 aagccctatt ctgcctctc cc 82

25 <210> 121
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> cebador

30 <400> 121
 taatacgact cactataggg agaggcaaga atagggc 37

<210> 122
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial

35 <220>
 <223> cebador

<400> 122
 tcctaattgctc tcttctcttc ac 22

40 <210> 123
 <211> 75
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> DNA molde

45 <400> 123
 gaggatccat gtatgcgcac atagggtttt tttcatcctg cagctccaca ggcttcccct 60
 tctggtcgaa gttct 75

50 <210> 124
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> cebador

 <400> 124
 cggaattcta atacgactca ctatagggag aacttcgacc agaag 45

 5 <210> 125
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial

 <220>
 10 <223> cebador

 <400> 125
 gaggatccat gtatgcgcac ata 23

 <210> 126
 <211> 71
 15 <212> DNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> DNA molde

 <220>
 20 <221> variación
 <222> 16
 <223> /reemplazar="t" /reemplazar="g" /reemplazar="t"

 <220>
 25 <221> variación
 <222> 17
 <223> /reemplazar="c" /reemplazar="g" /reemplazar="t"

 <220>
 30 <221> variación
 <222> 18
 <223> /reemplazar="c" /reemplazar="g" /reemplazar="t"

 <220>
 35 <221> variación
 <222> 20
 <223> /reemplazar="c" /reemplazar="g" /reemplazar="t"

 <220>
 40 <221> variación
 <222> 21
 <223> /reemplazar="c" /reemplazar="g" /reemplazar="t"

 <220>
 45 <221> variación
 <222> 22
 <223> /reemplazar="c" /reemplazar="g" /reemplazar="t"

 <220>
 50 <221> variación
 <222> 23
 <223> /reemplazar="c" /reemplazar="g" /reemplazar="t"

 <220>
 <221> variación
 <222> 24
 <223> /reemplazar="c" /reemplazar="g" /reemplazar="t"

<220>
 <221> variación
 <222> 25
 <223> /reemplazar="c" /reemplazar="g" /reemplazar="t"

5 <220>
 <221> variación
 <222> 26
 <223> /reemplazar="c" /reemplazar="g" /reemplazar="t"

10 <220>
 <221> variación
 <222> 27
 <223> /reemplazar="c" /reemplazar="g" /reemplazar="t"

15 <220>
 <221> variación
 <222> 28
 <223> /reemplazar="c" /reemplazar="g" /reemplazar="t"

20 <220>
 <221> variación
 <222> 29
 <223> /reemplazar="c" /reemplazar="g" /reemplazar="t"

 <220>
 <221> variación
 <222> 30
 <223> /reemplazar="c" /reemplazar="g" /reemplazar="t"

25 <220>
 <221> variación
 <222> 31
 <223> /reemplazar="c" /reemplazar="g" /reemplazar="t"

30 <220>
 <221> variación
 <222> 32
 <223> /reemplazar="c" /reemplazar="g" /reemplazar="t"

35 <220>
 <221> variación
 <222> 33
 <223> /reemplazar="c" /reemplazar="g" /reemplazar="t"

40 <220>
 <221> variación
 <222> 34
 <223> /reemplazar="c" /reemplazar="g" /reemplazar="t"

 <220>
 <221> variación
 <222> 35
 <223> /reemplazar="c" /reemplazar="g" /reemplazar="t"

45 <220>
 <221> variación
 <222> 36
 <223> /reemplazar="c" /reemplazar="g" /reemplazar="t"

50 <220>
 <221> variación
 <222> 37
 <223> /reemplazar="c" /reemplazar="g" /reemplazar="t"

 <220>
 <221> variación

<222> 38
 <223> /reemplazar="c" /reemplazar="g" /reemplazar="t"

 <220>
 <221> variación
 5 <222> 39
 <223> /reemplazar="c" /reemplazar="g" /reemplazar="t"

 <220>
 <221> variación
 <222> 40
 10 <223> /reemplazar="c" /reemplazar="g" /reemplazar="t"

 <220>
 <221> variación
 <222> 41
 <223> /reemplazar="c" /reemplazar="g" /reemplazar="t"

 15 <220>
 <221> variación
 <222> 42
 <223> /reemplazar="c" /reemplazar="g" /reemplazar="t"

 <220>
 20 <221> variación
 <222> 43
 <223> /reemplazar="c" /reemplazar="g" /reemplazar="t"

 <220>
 <221> variación
 25 <222> 44
 <223> /reemplazar="c" /reemplazar="g" /reemplazar="t"

 <220>
 <221> variación
 <222> 45
 30 <223> /reemplazar="c" /reemplazar="g" /reemplazar="t"

 <220>
 <221> variación
 <222> 46
 <223> /reemplazar="c" /reemplazar="g" /reemplazar="t"

 35 <220>
 <221> variación
 <222> 47
 <223> /reemplazar="c" /reemplazar="g" /reemplazar="t"

 <220>
 40 <221> variación
 <222> 48
 <223> /reemplazar="c" /reemplazar="g" /reemplazar="t"

 <220>
 <221> variación
 45 <222> 49
 <223> /reemplazar="c" /reemplazar="g" /reemplazar="t"

 <220>
 <221> variación
 <222> 50
 50 <223> /reemplazar="c" /reemplazar="g" /reemplazar="t"

 <220>
 <221> variación
 <222> 51
 <223> /reemplazar="c" /reemplazar="g" /reemplazar="t"

	<220>		
	<221> variación		
	<222> 52		
	<223> /reemplazar="c" /reemplazar="g" /reemplazar="t"		
5	<220>		
	<221> variación		
	<222> 53		
	<223> /reemplazar="c" /reemplazar="g" /reemplazar="t"		
	<220>		
10	<221> variación		
	<222> 54		
	<223> /reemplazar="c" /reemplazar="g" /reemplazar="t"		
	<220>		
	<221> variación		
15	<222> 55		
	<223> /reemplazar="c" /reemplazar="g" /reemplazar="t"		
	<400> 126		
	gggatcgaca gggctaataaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaccgag	60	
	tcgtgccatc t	71	
	<210> 127		
20	<211> 15		
	<212> DNA		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> cebador		
25	<400> 127		
	gggatcgaca gggct	15	
	<210> 128		
	<211> 16		
	<212> DNA		
30	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> cebador		
	<400> 128		
	agatggcacg actcgg	16	
35			

REIVINDICACIONES

1. Un aptámero que se une a NGF e inhibe la unión de NGF a un receptor de NGF, que comprende una secuencia
 UGAAAAAAACC (SEQ ID NO: 91),
 UGAAAGAAACC (SEQ ID NO: 92),
 5 UGAAAGAAACU (SEQ ID NO: 93),
 UGAAACAAACC (SEQ ID NO: 94),
 UGAAAAGAACC (SEQ ID NO: 95),
 UGAAAAAACCC (SEQ ID NO: 96),
 UGAAAAAACCU (SEQ ID NO: 97),
 10 UGAAAACAACC (SEQ ID NO: 98),
 UGAAAUAAACC (SEQ ID NO: 99),
 UGAAAUAAACU (SEQ ID NO: 100),
 UGAAAAAAUCU (SEQ ID NO: 101),
 AGAAUGAAACU (SEQ ID NO: 102),
 15 CGAACAAAACU (SEQ ID NO: 103),
 CGAAAGAAACU (SEQ ID NO: 104),
 UGAAAGGAACC (SEQ ID NO: 105),
 UGAAAAAAACY (SEQ ID NO: 110),
 UGAAAGAAACY (SEQ ID NO: 111),
 20 CGAACAAAACY (SEQ ID NO: 112), o
 CGAAAGAAACY (SEQ ID NO: 113);
 en donde Y es un nucleótido de pirimidina, y al menos un nucleótido está modificado.
2. El aptámero de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende una secuencia mostrada por UGAAAAAAACY
 (SEQ ID NO: 110), UGAAAGAAACY (SEQ ID NO: 111), CGAACAAAACY (SEQ ID NO: 112), CGAAAGAAACY
 25 (SEQ ID NO: 113) o AGAAUGAAACU (SEQ ID NO: 102), en donde Y es un nucleótido de pirimidina y al menos un
 nucleótido de la secuencia anteriormente mencionada está modificado.
3. El aptámero de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende una secuencia mostrada por
 UGAAAAAAACC (SEQ ID NO: 91), UGAAAGAAACC (SEQ ID NO: 92),
 UGAAAGAAACU (SEQ ID NO: 93), CGAACAAAACU (SEQ ID NO: 103),
 30 CGAAAGAAACU (SEQ ID NO: 104) o AGAAUGAAACU (SEQ ID NO: 102),
 en donde al menos un nucleótido de la secuencia anteriormente mencionada está modificado.
4. El aptámero de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la longitud del aptámero es de
 100 bases o menos.
5. El aptámero de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la longitud del aptámero es de
 35 60 bases o menos.
6. El aptámero de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde los grupos hidroxilo de la
 posición 2' de una ribosa de los respectivos nucleótidos de pirimidina son iguales o diferentes y están remplazados o
 no están remplazados por un átomo o grupo seleccionados del grupo que consiste en un átomo de hidrógeno, un
 átomo de flúor, y un grupo metoxi.
7. El aptámero de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde los grupos hidroxilo de la
 40 posición 2' de una ribosa de los respectivos nucleótidos de purina son iguales o diferentes y están remplazados o no

están remplazados por un átomo o grupo seleccionado del grupo que consiste en un átomo de hidrógeno, un átomo de flúor y un grupo metoxi.

8. El aptámero de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que inhibe la actividad de crecimiento de neuritas del NGF.

5 9. El aptámero de acuerdo con la reivindicación 8, que tiene una concentración inhibidora del 50% (CI50) de no más de 100 nM, preferiblemente no más de 10 nM, para la inhibición de una actividad de crecimiento de neuritas del NGF.

10. Un medicamento que comprende el aptámero de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.

10 11. El aptámero de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para su uso en la prevención y/o el tratamiento del dolor.

12. El aptámero de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para su uso en la prevención y/o el tratamiento de enfermedades inflamatorias.

FIG. 1

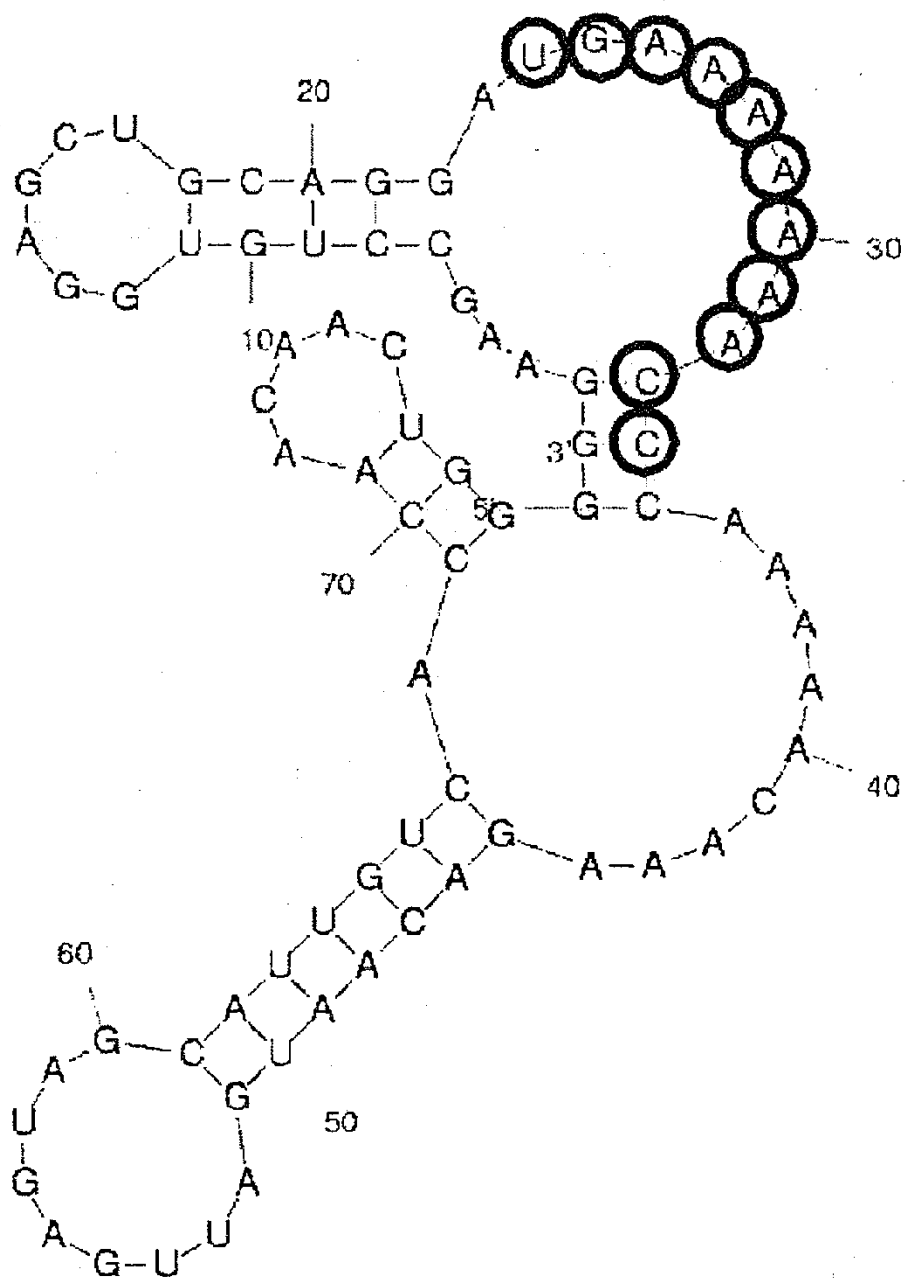


FIG. 2

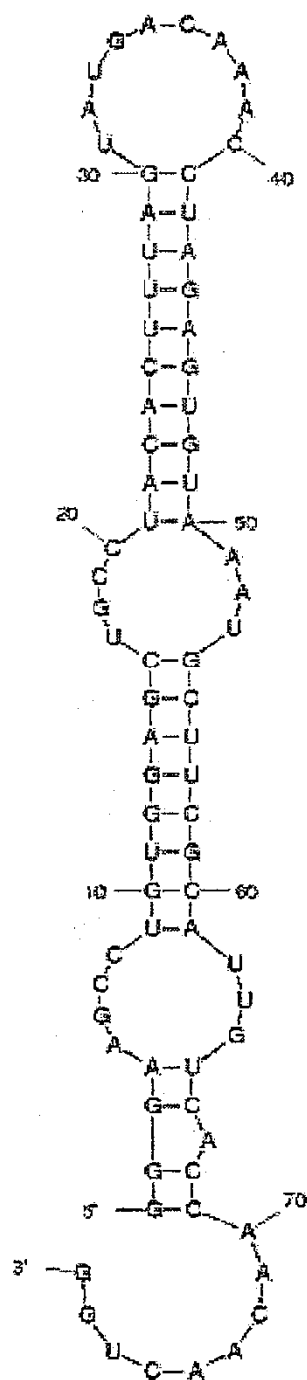


FIG. 3

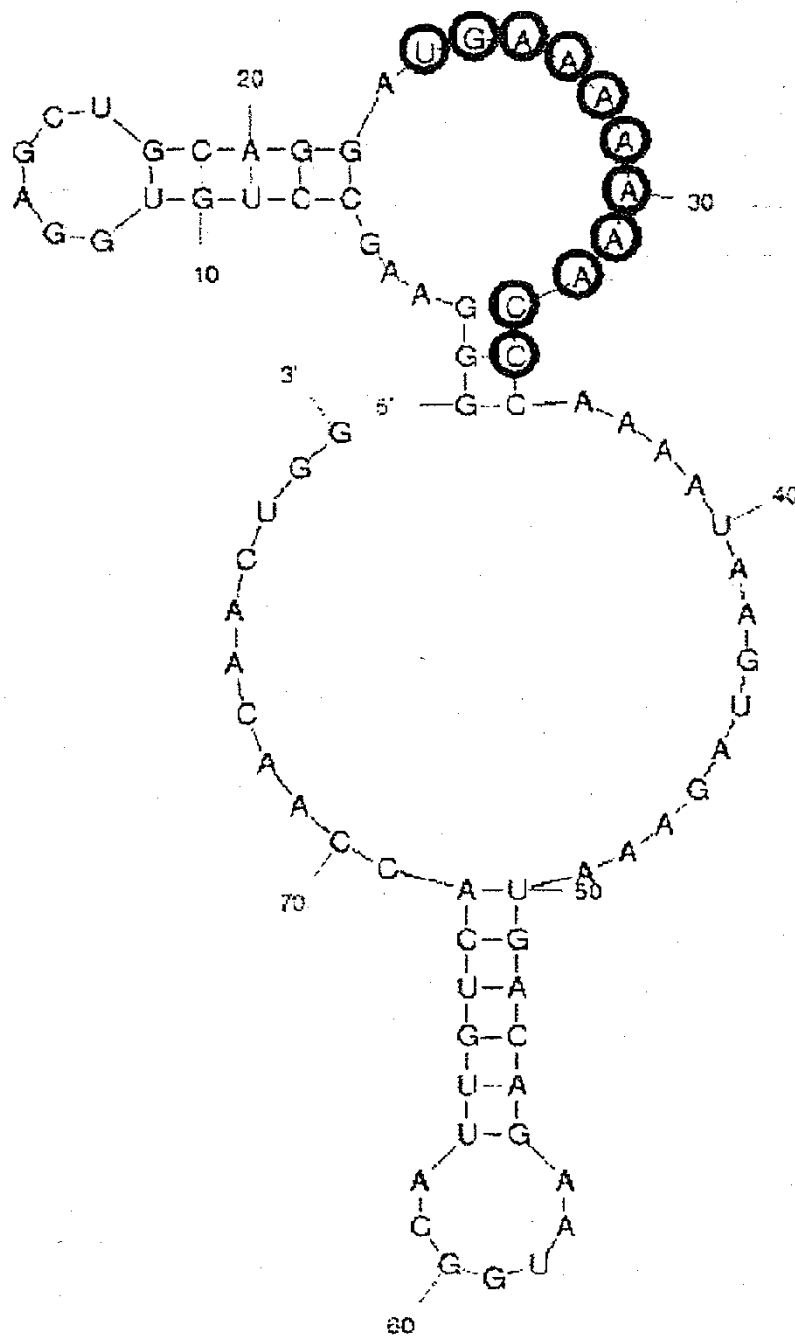


FIG. 4

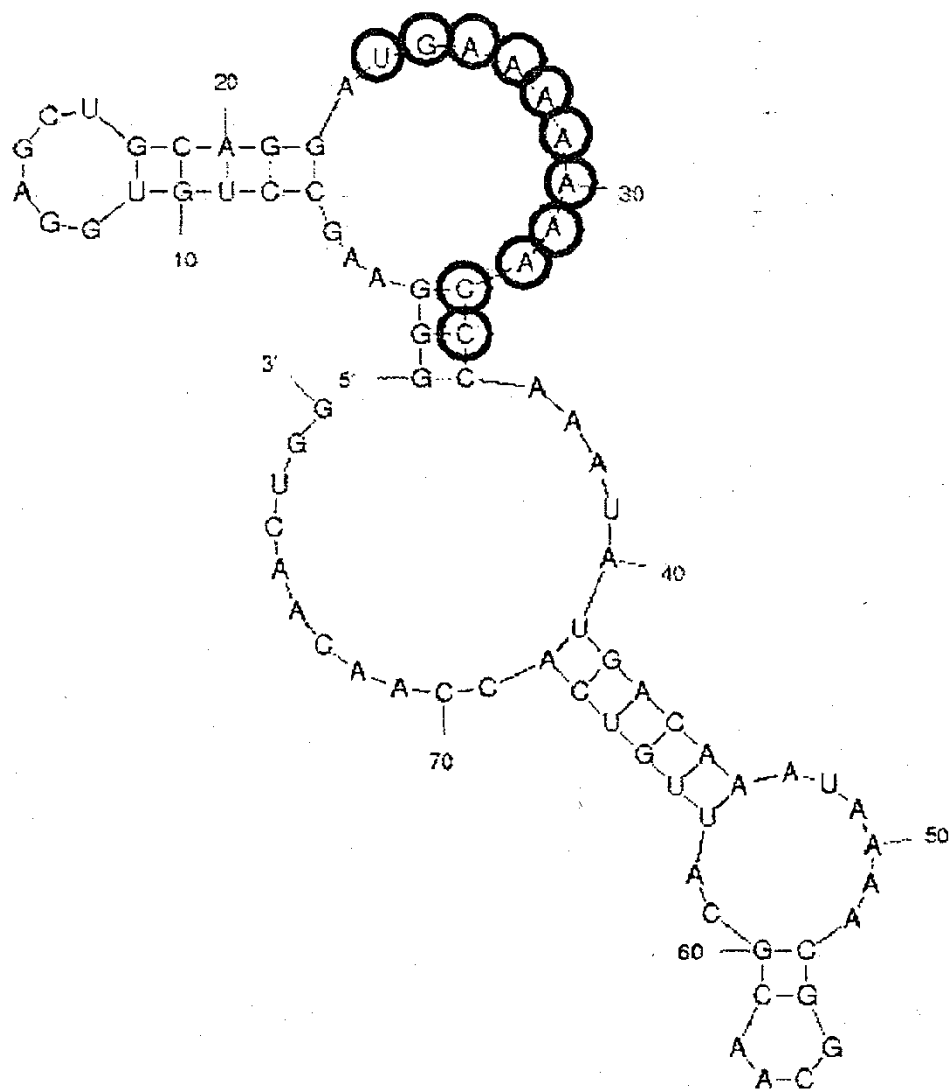


FIG. 5

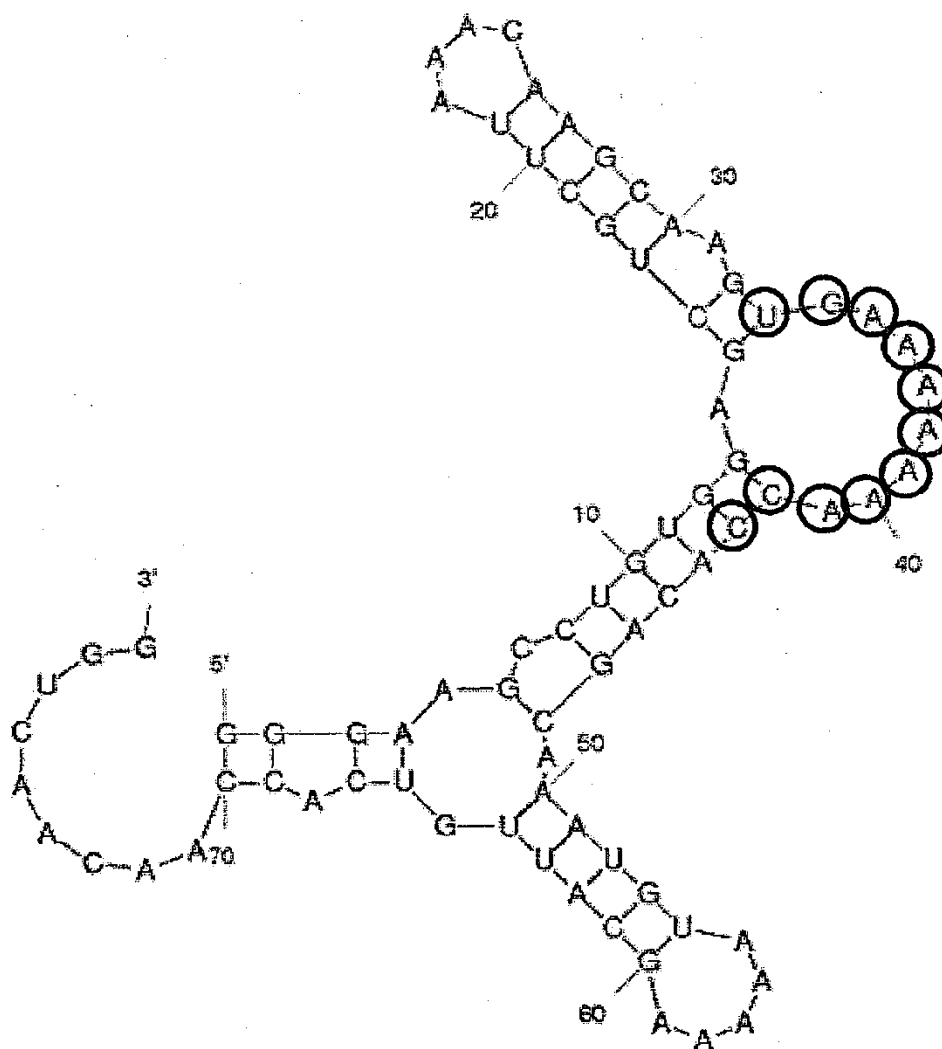


FIG. 6

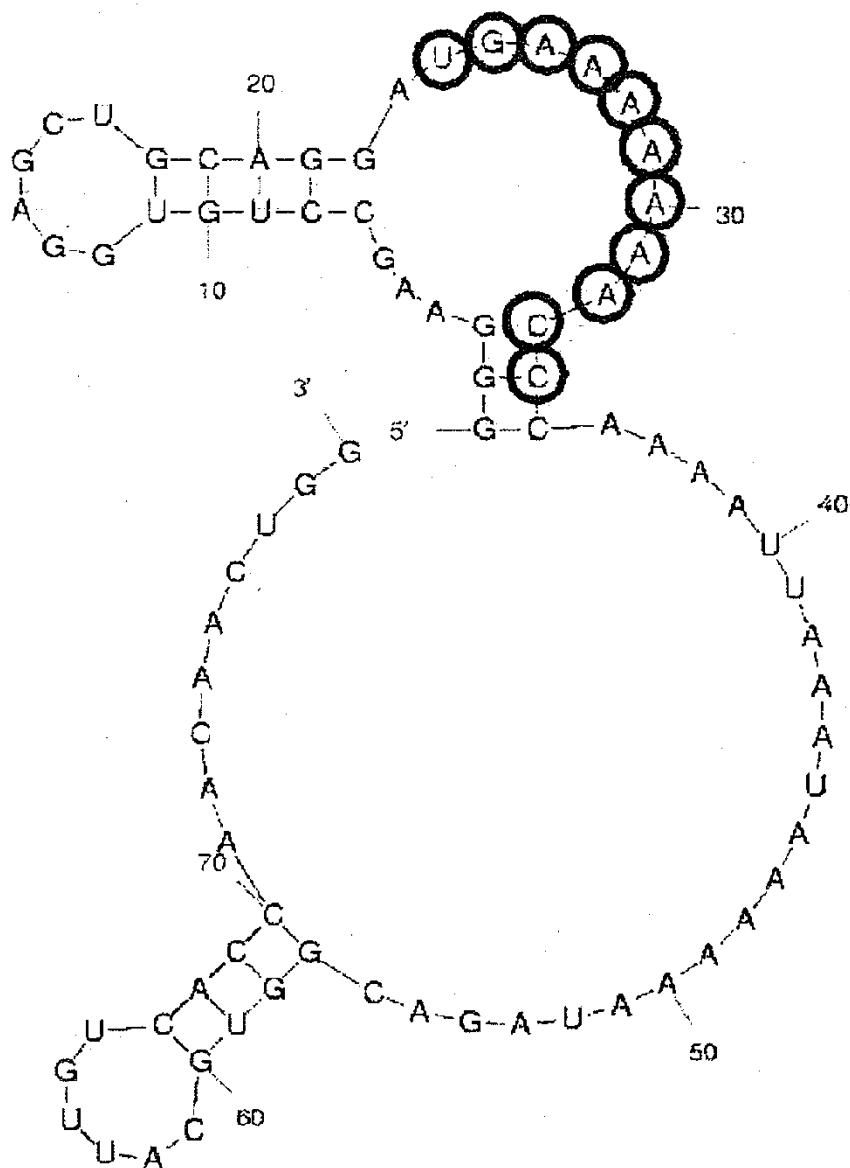


FIG. 7

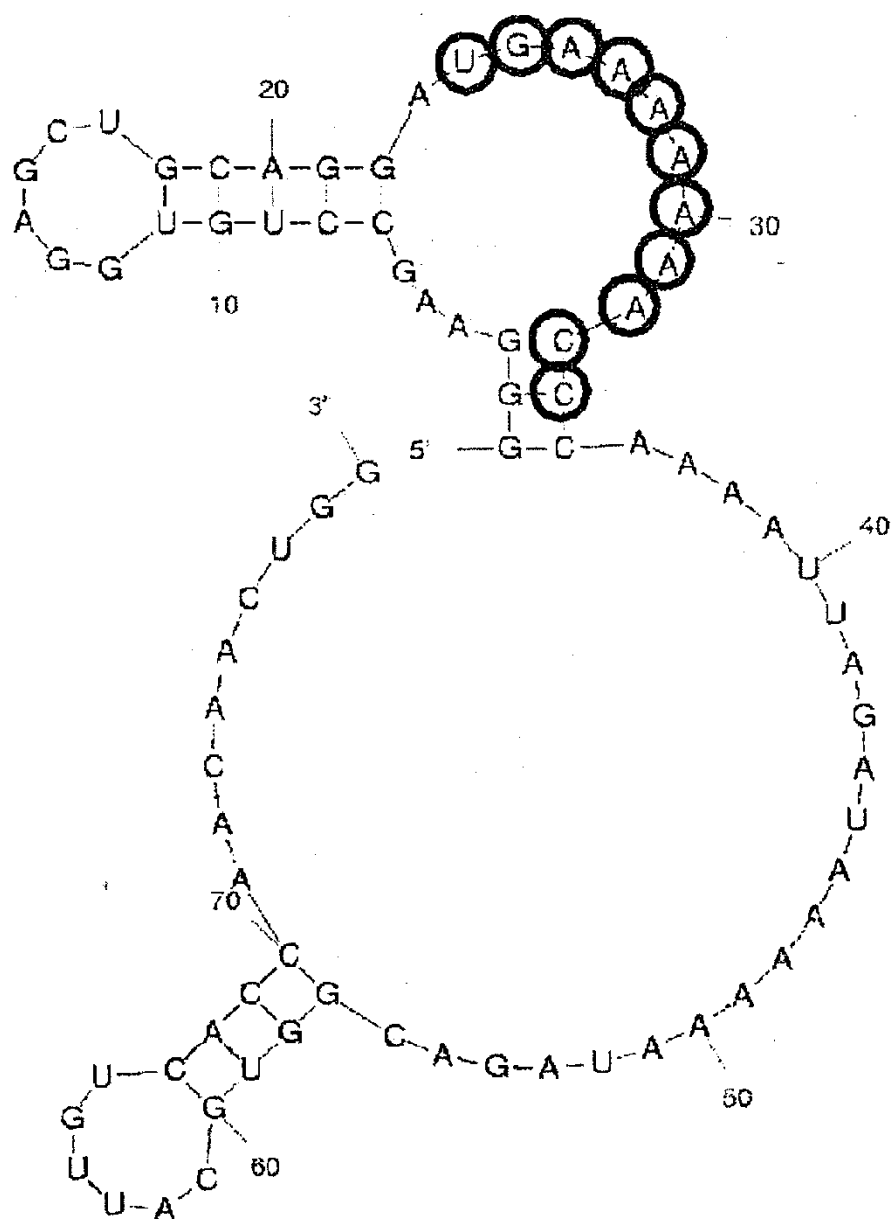


FIG. 8

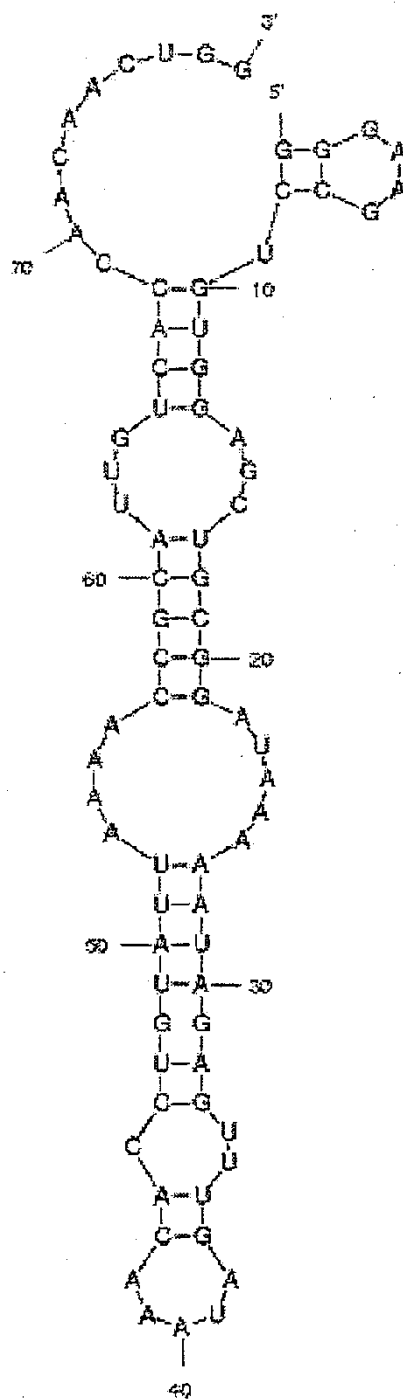


FIG. 9

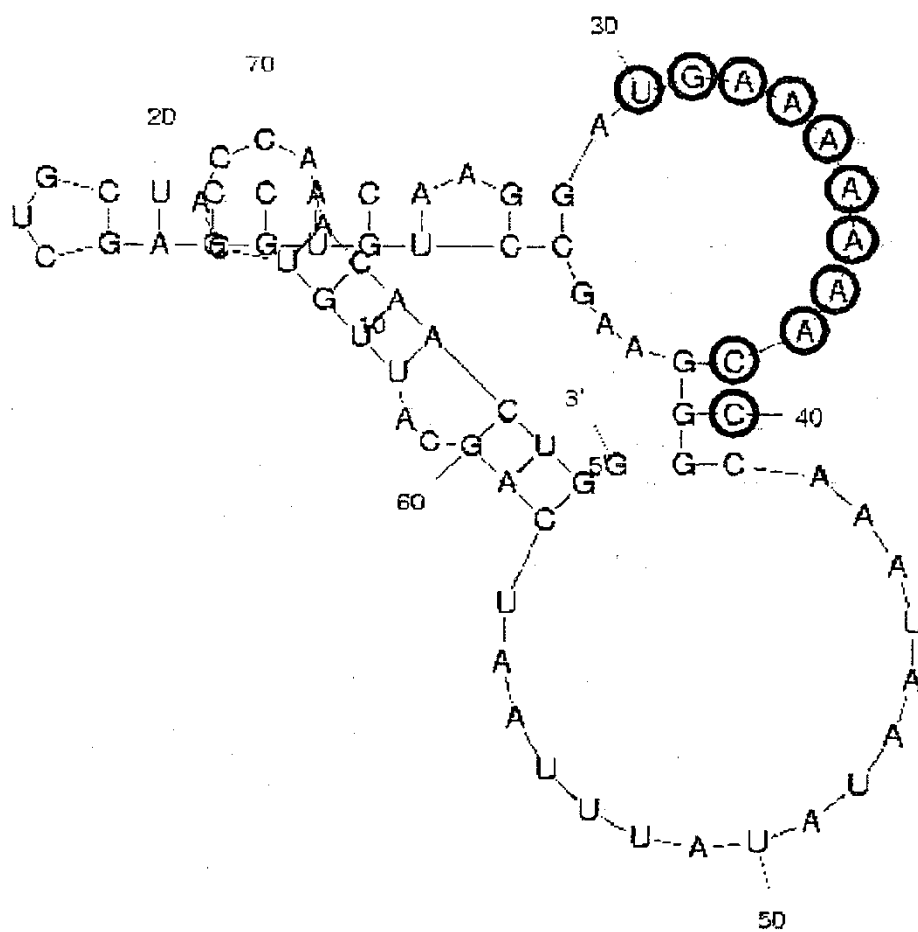


FIG. 10b

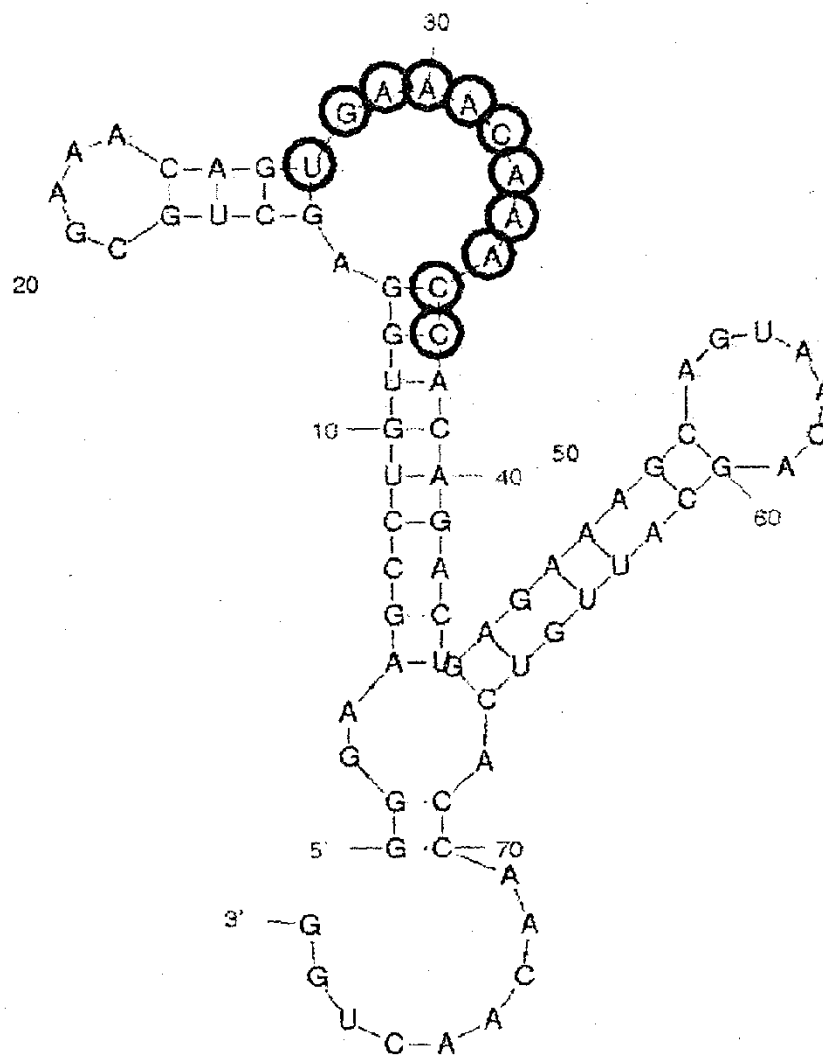


FIG. 11

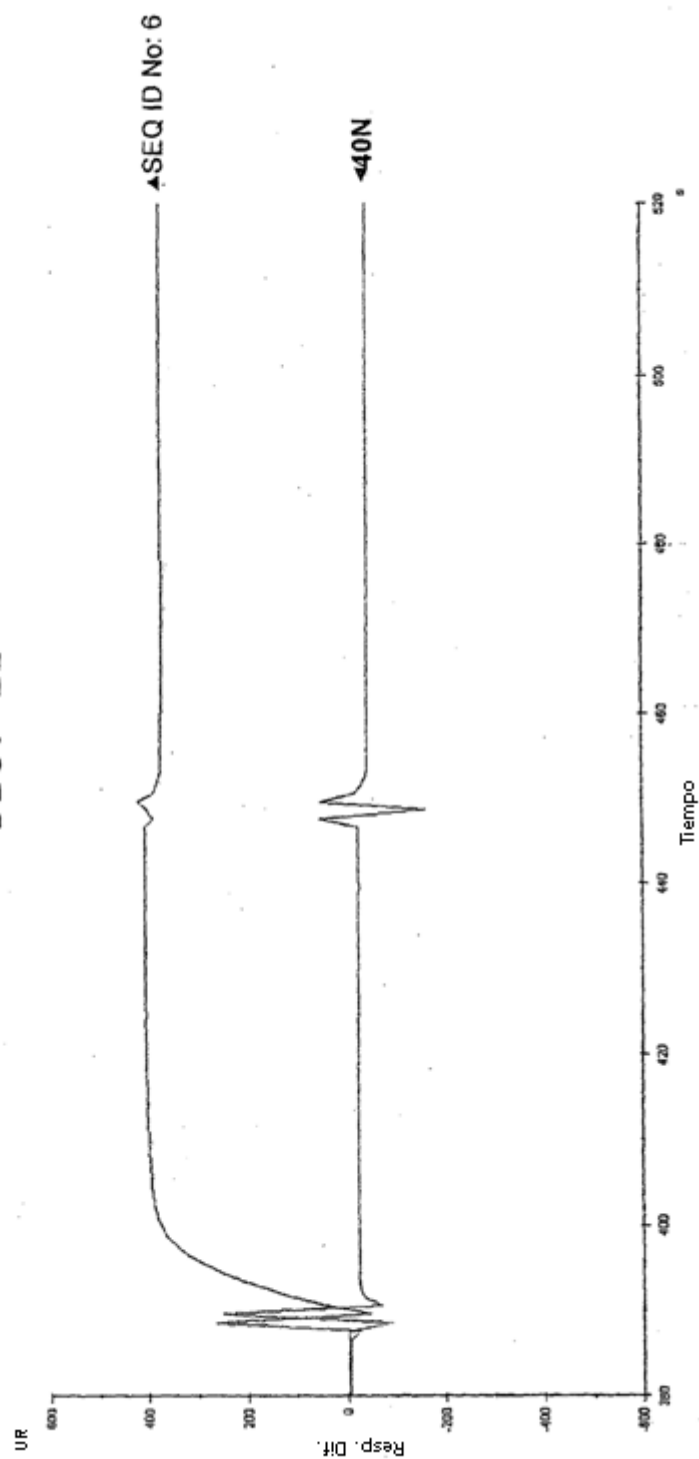


FIG. 12

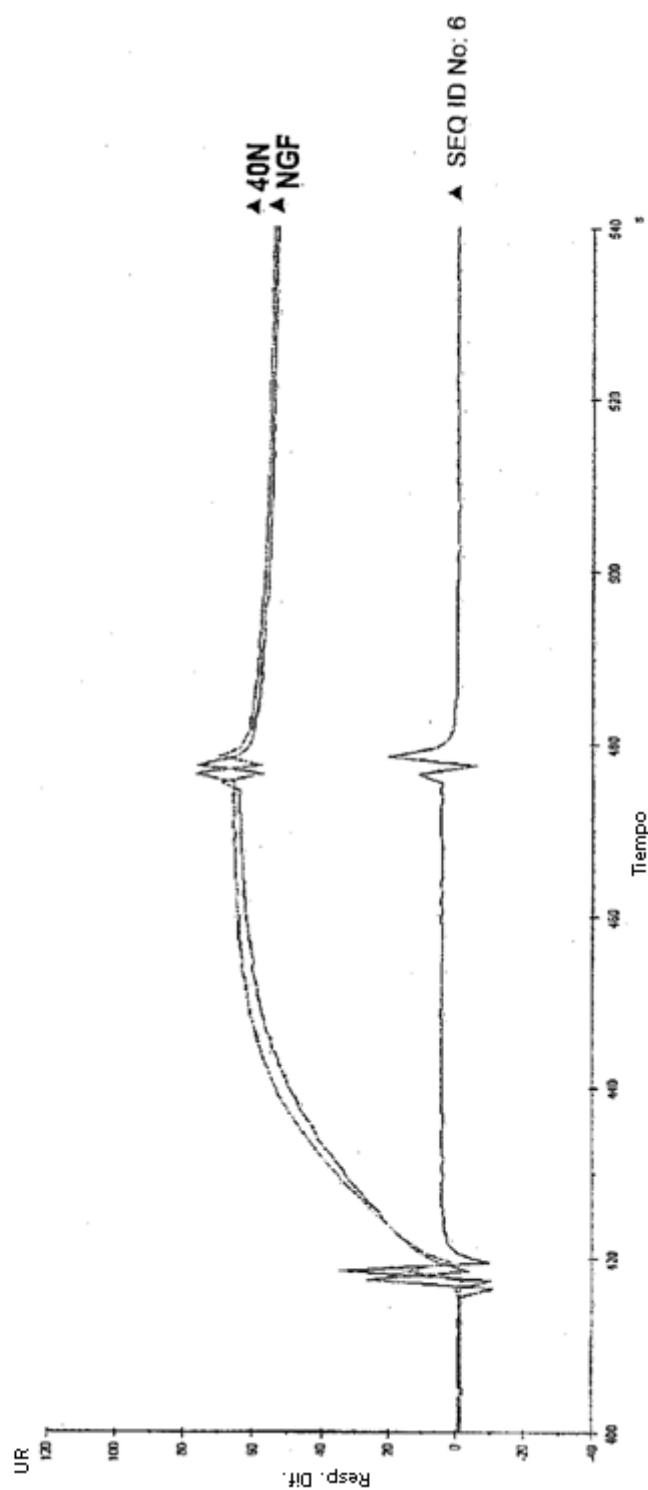


FIG. 13

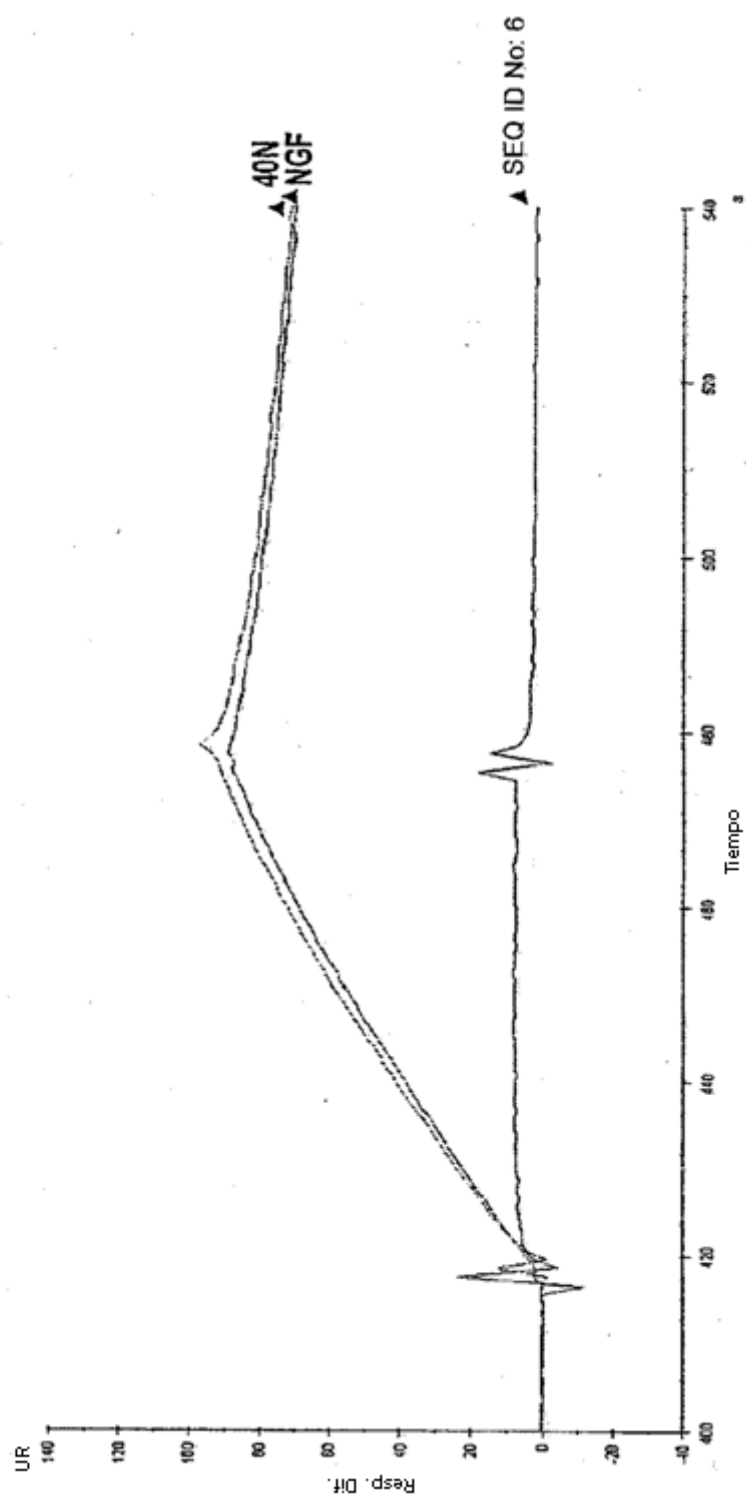


FIG. 14

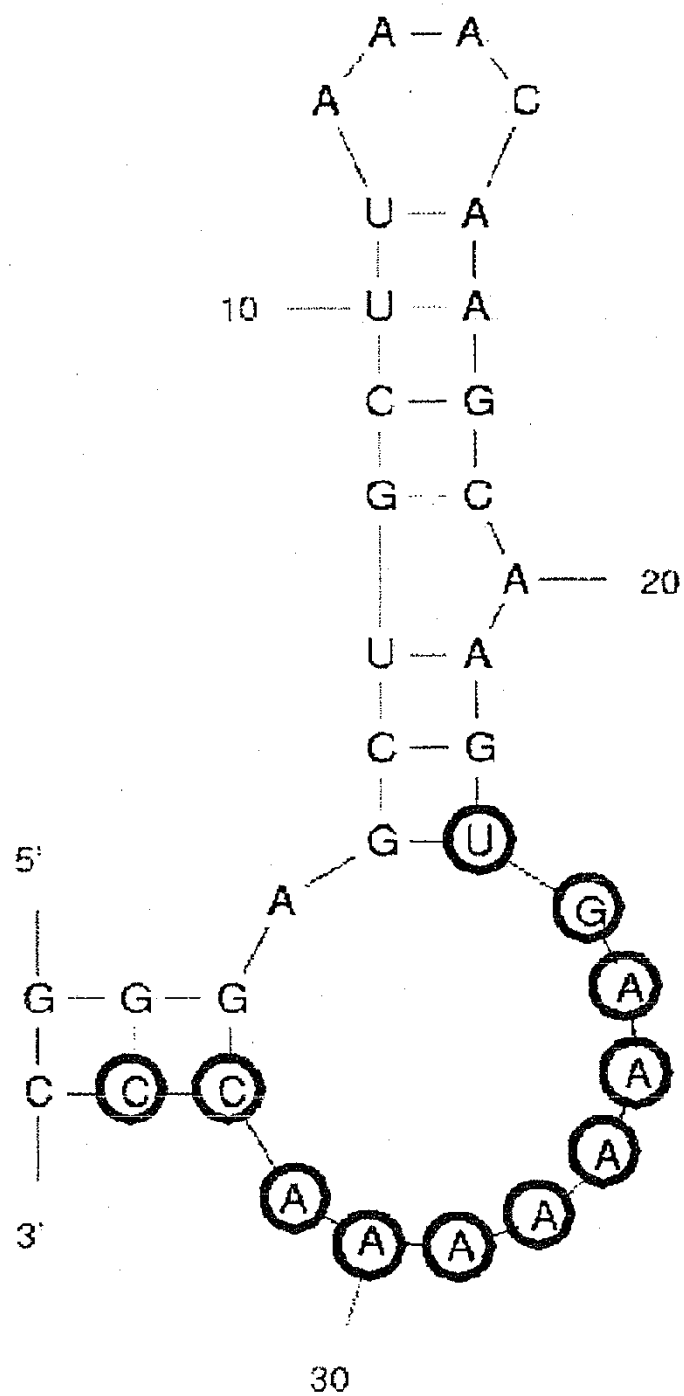


FIG. 15

