

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 567 270**

51 Int. Cl.:

C12N 15/115 (2010.01)

A61K 31/7088 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.03.2011** **E 11759487 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.01.2016** **EP 2551346**

54 Título: **Aptámero para FCN y utilización del mismo**

30 Prioridad:

24.03.2010 JP 2010068546

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

21.04.2016

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:

NAKAMURA, YOSHIKAZU;
JIN, LING y
HIRAMATSU, HISANAO

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 567 270 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 FCN y utilización del mismo

La presente descripción se refiere a un aptámero para FCN, a un método de utilización del mismo, y similares.

Técnica anterior

5 El factor de crecimiento nervioso (FCN) es la primera neurotrofina identificada en 1951, y es una proteína secretora importante implicada en el desarrollo y la supervivencia de las neuronas periféricas y centrales. Se compone de 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 la familia de proteínas que están bien conservadas estructuralmente y forman un homodímero con un enlace no covalente. Tiene una estructura de lámina β orientada en 3 direcciones diferentes, y se considera que está dimerizado en esta parte. También cuenta con cuatro estructuras de bucle con baja homología entre las familias, y estas partes se consideran que definen la especificidad para los receptores.

10 Como receptores de FCN, se conocen el receptor de tipo tirosina cinasa TrkA con alta afinidad y p75 con baja afinidad que pertenece a una superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral. Estos receptores actúan como un homodímero o un heterodímero y están muy implicados en el desarrollo y el mantenimiento del sistema nervioso. TrkA es un receptor transmembranal de paso único y tiene una estructura de tirosina cinasa en el dominio intracelular. Cuando FCN se une, se produce la fosforilación de la tirosina, la señal se transmite aguas abajo, y tiene lugar una mejora de la diferenciación y del mantenimiento de la supervivencia de la célula.

15 Como receptores de la familia de TrkA, se conocen TrkB y TrkC. TrkB se une a BDNF y NT-4/5, y TrkC se une a NT-3. p75 muestra menor especificidad de ligando en comparación con TrkA y también se une a BDNF, NT-3 y NT-4/5, además de FCN. Aunque p75 es un receptor transmembranal de paso único, no tiene un dominio de tirosina cinasa en el lado citoplásmico. Como TrkA, se expresa no solo en las células nerviosas, sino también en células no nerviosas. Este receptor es conocido por estar implicado en la mejora de la diferenciación y del mantenimiento de la supervivencia celular, así como por estar relacionado con la inducción de la apoptosis y la migración celular. Los resultados de análisis de la estructura cristalina han sugerido que un homodímero de FCN se une a TrkA en una relación 2:2 y a p75 en una relación 2:1. Un homodímero de FCN a veces se une a un heterodímero de TrkA y p75.

20 El FCN es producido por las células de Schwann, células queratinizadas, células del epitelio bronquial, fibroblastos, linfocitos T, macrófagos, mastocitos, linfocitos B, queratinocitos, células del músculo liso, células glomerulares renales, células del músculo esquelético y similares. Por otra parte, se sabe que TrkA se expresa en las células nerviosas, así como en monocitos, linfocitos T, linfocitos B y mastocitos, aparte de las células nerviosas. Del mismo modo, p75 se expresa en células nerviosas así como en células no nerviosas.

25 Es bien conocido que el FCN desempeña un papel clave en el sistema nervioso. Se ha aclarado que el FCN tiene una acción sobre el mantenimiento de la supervivencia de neuronas colinérgicas y se considera que está relacionado de algún modo con la enfermedad de Alzheimer. Además, ya que la administración intracerebral de FCN mejora trastornos de la memoria en ratas de edad avanzada, se supone también que actúa como fármaco terapéutico contra la demencia senil.

30 Se ha encontrado que el FCN actúa también sobre tejidos y células que no son del sistema nervioso, y que participan en el proceso de defensa corporal y de reparación de tejidos. Por ejemplo, se sabe que la administración de FCN a un animal aumenta la permeabilidad de los vasos sanguíneos, aumenta la respuesta inmune de los linfocitos T y linfocitos B, induce la diferenciación de linfocitos, induce el crecimiento de mastocitos, induce la liberación de varias citocinas desde los mastocitos y similares.

35 El FCN está relacionado con la inflamación, y se ha observado un aumento de la expresión de FCN en pacientes con enfermedades inflamatorias y en modelos animales de enfermedad inflamatoria. Lupus eritematoso sistémico, esclerosis múltiple, psoriasis, artritis, cistitis intersticial, asma y similares son ejemplos de las mismas. Se ha descrito que el líquido sinovial de pacientes con artritis reumatoide muestra una mayor concentración de FCN. Además, se ha descrito el aumento de la expresión de FCN en ratas que son modelos de artritis reumatoide, y el aumento de mastocitos y el aumento de la expresión de FCN en ratones que son modelos de artritis.

40 El FCN está profundamente implicado en el dolor. Cuando el FCN se administra por vía subcutánea a un ser humano, un dolor profundo, tal como dolor muscular, persiste durante varios días y tiene lugar una hiperalgesia del sitio de la inyección. Ratones con el gen de FCN desactivado y ratones con el gen de TrkA desactivado carecen de nervio sin mielina y no sienten dolor. Cuando el FCN se administra por vía intraperitoneal a 1 mg/kg a una rata madura, tiene lugar una hiperalgesia frente al calor nocivo y estímulos mecánicos. Un ratón transgénico con FCN muestra hiperalgesia que no está acompañada de estados inflamatorios. Además, se sabe que el gen TrkA de pacientes con insensibilidad congénita al dolor con anhidrosis (CIPA), tiene una anomalía y la sensación de dolor disminuye cuando el gen de FCN tiene una anomalía.

45 De ello se desprende que se puede utilizar un inhibidor de FCN como un fármaco terapéutico contra el dolor, tal como el dolor nociceptivo, dolor inflamatorio, dolor neuropático, dolor carcinomatoso, dolor por fibromialgia y simila-

res. Se ha descrito una terapia de combinación de anticuerpo de FCN y AINE (Referencia de patente 1), una terapia de combinación de anticuerpo de FCN y analgésico opioide (Referencia de Patente 2), un método de tratamiento del dolor postquirúrgico utilizando un anticuerpo de FCN (Referencia de patente 3, Referencia de patente 4), un método de tratamiento del dolor de cáncer de hueso utilizando un anticuerpo de FCN (Referencia de Patente 5) y un método de tratamiento del dolor de la osteoartritis utilizando un anticuerpo de FCN (Referencia de patente 6).

El tanezumab (PF-4383119 o RN624) es un anticuerpo contra el FCN, muestra un efecto en un experimento con modelo de dolor utilizando un modelo animal con osteoartritis, y está actualmente en fase de ensayo clínico. Si bien se desconoce la presencia o ausencia de una actividad inhibidora del FCN y del receptor de FCN, existe un informe en relación con ARN natural que se une a FCN (documento de no patente 1).

En los últimos años, las aplicaciones de aptámeros de ARN a medicamentos, agentes de diagnóstico y fármacos bajo estudio han llamado la atención; algunos aptámeros de ARN ya han estado en fase de estudio clínico o en uso práctico. En diciembre de 2004, el primer fármaco mundial de aptámero de ARN, Macugen, fue aprobado como fármaco terapéutico para la degeneración macular relacionada con la edad, en los EE.UU. Un aptámero de ARN se refiere a un ARN que se une específicamente a una molécula diana tal como una proteína, y se puede preparar usando el método SELEX (evolución sistemática de ligandos mediante enriquecimiento exponencial, de sus siglas en inglés: Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment)) (Referencias de patente 7 - 9). En la SELEX, un ARN que se une específicamente a una molécula diana se selecciona a partir de un conjunto de ARNs con aproximadamente 10^{14} secuencias de nucleótidos diferentes. La estructura del ARN utilizado tiene una secuencia al azar de aproximadamente 40 residuos, que está flanqueada por secuencias de cebadores. Se permite que este conjunto de ARNs se ensamble con una sustancia diana, y solo el ARN que se ha unido a la sustancia diana se recoge usando un filtro y similares. El ARN recogido se amplifica mediante RT-PCR, y se utiliza como molde para la siguiente ronda. Mediante la repetición de esta operación, aproximadamente 10 veces, se puede adquirir un aptámero de ARN que se une específicamente a la sustancia diana.

Los fármacos de aptámeros, tales como fármacos de anticuerpos, se pueden dirigir a factores extracelulares. Haciendo referencia a muchos artículos científicos y otros materiales de referencia del dominio público, los fármacos de aptámeros se considera que pueden superar potencialmente a los fármacos de anticuerpos en algunos aspectos. Por ejemplo, los aptámeros muestran frecuentemente mayor fuerza de unión y mayor especificidad que los anticuerpos. Los aptámeros son poco probable que se sometan a una eliminación inmune, y las reacciones adversas características de anticuerpos, tales como citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC) y citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), es poco probable que se produzcan con el uso de aptámeros. Desde el aspecto de la administración, ya que los aptámeros tienen aproximadamente 1/10 parte del tamaño de un anticuerpo, la administración de un fármaco en el sitio objeto es más fácil. Puesto que los aptámeros son producidos por síntesis química, se pueden realizar fácilmente diversas modificaciones, la reducción de los costes mediante producción a gran escala es posible. A la vez, las semividas en sangre de los aptámeros son generalmente más cortas que las de los anticuerpos; sin embargo, esta propiedad es a veces ventajosa de cara a la toxicidad. Estos hechos llevan a la conclusión de que, incluso cuando se dirigen a la misma molécula, los fármacos de aptámeros superan potencialmente a los fármacos de anticuerpos.

Los presentes inventores han producido, en el documento WO 2010/035725, un aptámero que se une a FCN y que inhibe la unión entre FCN y un receptor de FCN, y han encontrado que el aptámero inhibe una actividad de crecimiento de las neuritas de FCN. El documento de patente 10 describe un aptámero para FCN, que se obtiene por SELEX automatizada, y el documento de patente 11 describe un producto alterado y un producto modificado del aptámero obtenido en el documento de patente 10.

[Lista de documentos]

[documentos de patentes]

documento de patente 1: WO04/073653

documento de patente 2: WO04/096122

documento de patente 3: WO04/032870

documento de patente 4: WO05/000194

documento de patente 5: WO05/111077

documento de patente 6: WO06/110883

documento de patente 7: WO91/19813

documento de patente 8: WO94/08050

documento de patente 9: WO95/07364

documento de patente 10: WO02/077262

documento de patente 11: WO03/070984

[documento de no patente]

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

- 5 La presente descripción tiene como objetivo proporcionar un aptámero para FCN, un método para utilizar el mismo y similares. En particular, la presente descripción tiene como objetivo proporcionar un aptámero que tiene una longitud de cadena corta, que es adecuado para uso como producto farmacéutico.

10 Los presentes inventores investigaron diligentemente para resolver el problema descrito anteriormente y tuvieron éxito en la preparación de un aptámero para FCN de mejor calidad, lo que dio como resultado la consecución de la presente invención.

De acuerdo con ello, la presente invención proporciona lo siguiente.

[1] Un aptámero que se une a FCN, que satisface los siguientes (1) y (2):

(1) que comprende una cualquiera de las secuencias de nucleótidos (a), (b) y (c) a continuación:

- 15 (a) una secuencia de nucleótidos seleccionada entre SEQ ID NOs: 1 - 54 (en donde uracilo puede ser timina);
(b) una secuencia de nucleótidos seleccionada entre SEQ ID NOs: 1 - 54 (en donde uracilo puede ser timina), en la que 1 a 4 nucleótidos están sustituidos, deletados, insertados o añadidos; y
(c) una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad del 90% o superior con una secuencia de nucleótidos seleccionada entre SEQ ID NOs: 1 - 54 (en donde uracilo puede ser timina), y

(2) que tiene una longitud de bases que no es superior a 73.

20 [2] El aptámero de acuerdo con [1], que inhibe la unión entre FCN y un receptor de FCN.

[3] El aptámero de acuerdo con [1] o [2], que inhibe la actividad de crecimiento de neuritas o la actividad de proliferación celular de FCN.

[4] El aptámero de acuerdo con [3], que tiene una concentración inhibitoria del 50% que no es superior a 10 nM.

[5] El aptámero de acuerdo con una cualquiera de [1] a [4], que no se une a NT-3.

25 [6] El aptámero de acuerdo con una cualquiera de [1] a [5], que no inhibe la actividad de proliferación celular de BDNF, NT-3 o NT-4/5.

[7] El aptámero de acuerdo con una cualquiera de [1] a [6], en el que al menos un nucleótido está modificado.

[8] El aptámero de acuerdo con [7], que está modificado con dT invertida o polietilenglicol.

30 [9] El aptámero de acuerdo con una cualquiera de [7] u [8], en el que los grupos hidroxilo en la posición 2' de una ribosa de los nucleótidos de pirimidina respectivos son iguales o diferentes y no están reemplazados o están reemplazados por un átomo o un grupo seleccionado a partir del grupo que consiste en un átomo de hidrógeno, un átomo de flúor y un grupo metoxi.

35 [10] El aptámero de acuerdo con una cualquiera de [7] u [8], en el que los grupos hidroxilo en la posición 2' de una ribosa de los nucleótidos de purina respectivos son iguales o diferentes y no están reemplazados o están reemplazados por un átomo o un grupo seleccionado a partir del grupo que consiste en un átomo de hidrógeno, un átomo de flúor y un grupo metoxi.

[11] Un complejo que comprende el aptámero de acuerdo con una cualquiera de [1] a [10] y una sustancia funcional.

[12] Una composición farmacéutica que comprende el aptámero de acuerdo con una cualquiera de [1] a [10] o el complejo de [11].

40 [13] Un agente contra el dolor que comprende el aptámero de acuerdo con una cualquiera de [1] a [10] o el complejo de [11].

[14] El aptámero de acuerdo con una cualquiera de [1] a [10] o el complejo de [11], para la profilaxis o el tratamiento de una enfermedad que está acompañada de dolor o inflamación.

También se describe en esta memoria lo siguiente.

- [1] Un aptámero que se une a FCN, que satisface los siguientes (1) y (2):
- (1) que comprende la secuencia representada por UGAAARAAACC (SEQ ID NO: 64) o CGAAMRAAACU (SEQ ID NO: 65), y
 - (2) que tiene una longitud de bases que no es superior a 73.
- 5 [2] El aptámero de acuerdo con [1], que inhibe la unión entre FCN y un receptor de FCN.
- [3] El aptámero de acuerdo con [1] o [2], que inhibe la actividad de crecimiento de neuritas o la actividad de proliferación celular de FCN.
- [4] El aptámero de acuerdo con [3], que tiene una concentración inhibitoria del 50% que no es superior a 10 nM.
- [5] El aptámero de acuerdo con una cualquiera de [1] a [4], que no se une a NT-3.
- 10 [6] El aptámero de acuerdo con una cualquiera de [1] a [5], que no inhibe la actividad de proliferación celular de BDNF, NT-3 o NT-4/5.
- [7] El aptámero de acuerdo con [1] o [2], que comprende cualquiera de las secuencias de nucleótidos (a), (b) y (c) a continuación:
- (a) una secuencia de nucleótidos seleccionada entre SEQ ID NOs: 1 - 54 (en donde uracilo puede ser timina);
 - 15 (b) una secuencia de nucleótidos seleccionada entre SEQ ID NOs: 1 - 54 (en donde uracilo puede ser timina), en la que de 1 a varios nucleótidos están sustituidos, delecionados, insertados o añadidos; y
 - (c) una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad del 70% o superior con una secuencia de nucleótidos seleccionada entre SEQ ID NOs: 1 - 54 (en donde uracilo puede ser timina).
- [8] El aptámero de acuerdo con una cualquiera de [1] a [7], en el que al menos un nucleótido está modificado.
- 20 [9] El aptámero de acuerdo con [8], que está modificado con dT invertida o polietilenglicol.
- [10] El aptámero de acuerdo con [9], en el que la dT invertida o el polietilenglicol se une al extremo 5' terminal o 3' terminal del aptámero.
- [11] El aptámero de acuerdo con una cualquiera de [8] a [10], en el que los grupos hidroxilo en la posición 2' de una ribosa de los nucleótidos de pirimidina respectivos son iguales o diferentes y no están reemplazados o están reemplazados por un átomo o un grupo seleccionado a partir del grupo que consiste en un átomo de hidrógeno, un átomo de flúor y un grupo metoxi.
- 25 [12] El aptámero de acuerdo con una cualquiera de [8] a [10], en el que los grupos hidroxilo en la posición 2' de una ribosa de los nucleótidos de purina respectivos son iguales o diferentes y no están reemplazados o están reemplazados por un átomo o un grupo seleccionado a partir del grupo que consiste en un átomo de hidrógeno, un átomo de flúor y un grupo metoxi.
- 30 [13] Un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada entre SEQ ID NOs: 1 - 54 y que tiene una longitud de bases que no es superior a 73.
- [14] El ácido nucleico de acuerdo con [13], en el que al menos un nucleótido está modificado.
- [15] El ácido nucleico de acuerdo con [14], que está modificado con dT invertida o polietilenglicol.
- 35 [16] El ácido nucleico de acuerdo con [15], en el que la dT invertida o el polietilenglicol se une al extremo 5' terminal o 3' terminal del aptámero.
- [17] El ácido nucleico de acuerdo con una cualquiera de [14] a [16], en el que los grupos hidroxilo en la posición 2' de una ribosa de los nucleótidos de pirimidina respectivos son iguales o diferentes y no están reemplazados o están reemplazados por un átomo o un grupo seleccionado a partir del grupo que consiste en un átomo de hidrógeno, un átomo de flúor y un grupo metoxi.
- 40 [18] El ácido nucleico de acuerdo con una cualquiera de [14] a [16], en el que los grupos hidroxilo en la posición 2' de una ribosa de nucleótidos de purina respectivos son iguales o diferentes y no están reemplazados o están reemplazados por un átomo o un grupo seleccionado a partir del grupo que consiste en un átomo de hidrógeno, un átomo de flúor y un grupo metoxi.
- 45 [19] Un aptámero con sustancia hidrófoba añadida, que se une a FCN.
- [20] El aptámero de acuerdo con [19], que inhibe la unión entre FCN y un receptor de FCN.

[21] El aptámero de acuerdo con [20], que inhibe la actividad de crecimiento de neuritas o la actividad de proliferación celular de FCN.

[22] El aptámero de acuerdo con [21], que tiene una concentración inhibitoria del 50% que no es superior a 10 nM.

5 [23] El aptámero de acuerdo con [19] o [20], que comprende una cualquiera de las secuencias de nucleótidos (a'), (b') y (c') a continuación:

(a') una secuencia de nucleótidos seleccionada entre SEQ ID NO: 55 - 63 (en donde uracilo puede ser timina);

(b') una secuencia de nucleótidos seleccionada entre SEQ ID NO: 55 - 63 (en donde uracilo puede ser timina), en la que de 1 a varios nucleótidos están sustituidos, delecionados, insertados o añadidos; y

10 (c') una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad del 70% o superior con una secuencia de nucleótidos seleccionada entre SEQ ID NO: 55 - 63 (en donde uracilo puede ser timina).

[24] El aptámero de acuerdo con una cualquiera de [19] a [23], en el que la sustancia hidrófoba se une al extremo 5' terminal del aptámero.

[25] El aptámero de acuerdo con una cualquiera de [19] a [24], en el que la sustancia hidrófoba es colesterol.

15 [26] El aptámero de acuerdo con una cualquiera de [19] a [25], en el que se modifica al menos un nucleótido.

[27] El aptámero de acuerdo con [26], que se modifica con dT invertida.

[28] El aptámero de acuerdo con [27], en el que la dT invertida está unida al extremo 3' terminal del aptámero.

20 [29] El aptámero de acuerdo con una cualquiera de [26] a [28], en el que los grupos hidroxilo en la posición 2' de una ribosa de los nucleótidos de pirimidina respectivos son iguales o diferentes y no están reemplazados o están reemplazados por un átomo o un grupo seleccionado a partir del grupo que consiste en un átomo de hidrógeno, un átomo de flúor y un grupo metoxi.

25 [30] El aptámero de acuerdo con una cualquiera de [26] a [28], en el que los grupos hidroxilo en la posición 2' de una ribosa de los nucleótidos de purina respectivos son iguales o diferentes y no están reemplazados o están reemplazados por un átomo o un grupo seleccionado a partir del grupo que consiste en un átomo de hidrógeno, un átomo de flúor y un grupo metoxi.

[31] Un complejo que comprende el aptámero de acuerdo con una cualquiera de [1] a [12], [19] a [30] o el ácido nucleico de acuerdo con una cualquiera de [13] a [18], y una sustancia funcional.

[32] El complejo de acuerdo con [31], en el que la sustancia funcional es una sustancia de afinidad, una sustancia marcadora, una enzima, un vehículo de administración de fármaco o un fármaco.

30 [33] Una composición farmacéutica que comprende el aptámero de acuerdo con una cualquiera de [1] a [12] y [19] a [30], el ácido nucleico de acuerdo con una cualquiera de [13] a [18] o el complejo de [31] o [32].

[34] Un agente contra el dolor que comprende el aptámero de acuerdo con una cualquiera de [1] a [12] y [19] a [30], el ácido nucleico de acuerdo con una cualquiera de [13] a [18] o el complejo de [31] o [32].

35 [35] Un agente antiinflamatorio que comprende el aptámero de acuerdo con una cualquiera de [1] a [12] y [19] a [30], el ácido nucleico de acuerdo con una cualquiera de [13] a [18] o el complejo de [31] o [32].

[36] Un método para tratar o prevenir una enfermedad que está acompañada de dolor o inflamación, que comprende administrar el aptámero de acuerdo con una cualquiera de [1] a [12] y [19] a [30], el ácido nucleico de acuerdo con una cualquiera de [13] a [18] o el complejo de [31] o [32] a un sujeto que tiene necesidad del mismo.

40 [37] El aptámero de acuerdo con una cualquiera de [1] a [12] y [19] a [30], el ácido nucleico de acuerdo con una cualquiera de [13] a [18] o el complejo de [31] o [32] para la profilaxis o el tratamiento de una enfermedad que está acompañada de dolor o inflamación.

45 El aptámero de la presente descripción, un aptámero con sustancia hidrófoba añadida y un complejo de los mismos pueden ser útiles como medicamentos, agentes de diagnóstico o reactivos para enfermedades tales como enfermedad acompañada de dolor, enfermedad inflamatoria y similares. El aptámero y el complejo de la presente descripción también pueden ser útiles para la purificación y la concentración de FCN, así como para la detección y la cuantificación de FCN.

Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 es un sensograma que muestra que los aptámeros (Apt) mostrados por los nº de identificación de aptámero

(ID de aptámero NOs) 26, 48 y 57 se unen a FCN humano. ID de aptámero: 26 (-) significa un aptámero obtenido mediante la introducción de una mutación en el aptámero mostrado por ID de aptámero: 26 (g19 → g (M)), y la eliminación de la actividad de unión.

5 La presente descripción proporciona un aptámero que se une a FCN, que comprende la secuencia representada por UGAAARAAACC (SEQ ID NO: 64) o CGAAMRAAACU (SEQ ID NO: 65), y tiene una longitud de bases que no es superior a 73 (en lo sucesivo se describe como "el aptámero de la presente descripción").

Estas secuencias pueden tener la modificación mencionada a continuación. La presente invención proporciona un aptámero que se une a FCN, que satisface (1) y (2) siguientes:

(1) que comprende una cualquiera de las secuencias de nucleótidos (a), (b) y (c) a continuación:

- 10 (a) una secuencia de nucleótidos seleccionada entre SEQ ID NOs: 1 - 54 (en donde uracilo puede ser timina);
- (b) una secuencia de nucleótidos seleccionada entre SEQ ID NOs: 1 - 54 (en donde uracilo puede ser timina), en la que 1 a 4 nucleótidos están sustituidos, deletados, insertados o añadidos; y
- (c) una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad del 90% o superior con una secuencia de nucleótidos seleccionada entre SEQ ID NOs: 1 - 54 (en donde uracilo puede ser timina), y

15 (2) que tiene una longitud de bases que no es superior a 73.

La presente invención proporciona un aptámero que tiene una actividad de unión a FCN. Según una realización preferible, el aptámero de la presente invención se une a FCN, y puede inhibir la actividad de FCN mediante la inhibición de la unión entre FCN y un receptor de FCN.

20 Un aptámero se refiere a una molécula de ácido nucleico que tiene una actividad de unión con una molécula diana particular. El aptámero puede inhibir la actividad de una molécula diana particular mediante la unión a la molécula diana particular. El aptámero de la presente descripción puede ser un ácido nucleico tal como un ARN, un ADN, un ácido nucleico modificado o una mezcla de los mismos. El aptámero de la presente descripción también puede ser un ácido nucleico en forma lineal o circular.

25 En otras palabras, a continuación se puede hacer referencia al aptámero de la presente descripción como "el ácido nucleico de la presente descripción".

30 En la presente descripción, una secuencia especificada por "SEQ ID NO" significa cada aptámero o una secuencia de nucleótidos de un ácido nucleico y, por ejemplo, "un ácido nucleico que comprende la secuencia mostrada por SEQ ID NO: 1" significa un ácido nucleico natural o un ácido nucleico modificado que comprende la secuencia mostrada por SEQ ID NO: 1 o un ácido nucleico constituido por ambos. La secuencia de bases de SEQ ID NO de cada aptámero se describe en el Listado de Secuencias.

35 El FCN es una neurotrofina conocida, y es una proteína secretora importante implicada en el desarrollo y la supervivencia de las neuronas periféricas y centrales. En la presente invención, FCN significa en particular un FCN de tipo β . Las secuencias de aminoácidos de FCN- β humano son las que se muestran con los números de orden NP002497, P01138, AAI26151, AAI26149 y CAB75625, que también pueden ser una con mutación, su dominio o su péptido. Puede que no sea solo un monómero, sino también un dímero o un multímero.

El aptámero de la presente invención se une a FCN en un tampón fisiológico (por ejemplo, solución A: véase el Ejemplo 2). El aptámero de la presente invención se une, por ejemplo, a FCN con una intensidad detectable a través del ensayo siguiente.

40 Para la medición, se empleó BIAcore2000 fabricado por BIAcore. Un aptámero se inmoviliza sobre un chip sensor. La cantidad que se va a inmovilizar se ajusta a 1000 UR. Un tampón fisiológico que contiene NaCl 0,3 M (solución A: véase el Ejemplo 2) se utiliza para preparar la solución de FCN (0,5 μ M). Se inyecta esta solución de FCN (20 μ L) y se detecta la unión de FCN con el aptámero. Como control negativo se emplea ARN que contiene un nucleótido al azar que consiste en 40 nucleótidos, cuando FCN se une de forma significativamente fuerte con el aptámero, en comparación con el ARN control, el aptámero se evalúa para saber si tiene capacidad de unión a FCN.

45 El aptámero de la presente invención inhibe la actividad de FCN mediante la unión a FCN e inhibiendo la unión de FCN y un receptor de FCN. En la presente memoria descriptiva, la "actividad inhibitoria frente a FCN" se refiere a una capacidad inhibitoria sobre cualquier actividad que tenga FCN. Por ejemplo, significa una actividad que inhibe que el FCN se una a un receptor de FCN.

50 Además, ejemplos de otra "actividad inhibitoria frente a FCN" incluyen la inhibición de la transducción de señales aguas abajo del receptor de FCN (vía de la cinasa Ras-MAP, vía de la cinasa PI3), la inhibición de un aumento de la expresión de TRPV1, SP, BDNF y similares, la actividad inhibitoria de la expresión de HA, BK, PG, FCN y otra citocina liberada desde los mastocitos etc., y similares, que dan como resultado la unión de FCN al receptor de FCN.

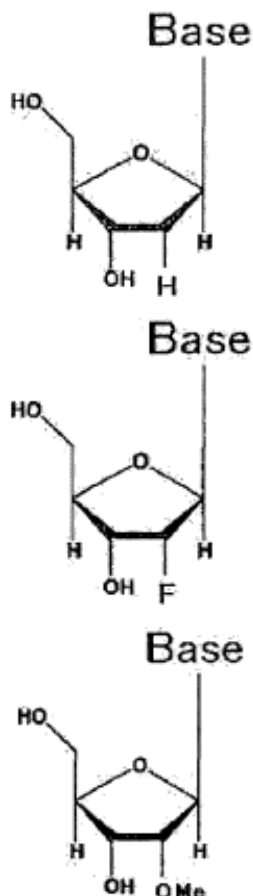
- Además, se puede mencionar la inhibición de la diferenciación, la supervivencia, el crecimiento de neuritas de las células nerviosas inducido por FCN, la permeabilidad de los vasos sanguíneos, la potenciación de la respuesta inmune de los linfocitos T y los linfocitos B, la diferenciación de linfocitos, el crecimiento y similares de diversas células tales como mastocitos, células eritroleucémicas, células cancerígenas y similares, el alivio del dolor, la hiperalgesia y similares.
- Preferiblemente una "actividad inhibitoria frente a FCN" que tiene el aptámero de la presente invención, es una actividad para inhibir la unión entre FCN y el receptor de FCN, una actividad para inhibir la actividad de crecimiento de neuritas inducida por FCN, una actividad para inhibir la actividad de proliferación celular inducida por FCN y similares.
- En la presente memoria descriptiva, el "receptor de FCN" se refiere a una proteína de la superficie celular a la que se une FCN. Como receptor de FCN, se conocen TrkA y p75. El receptor de FCN al que se hace referencia en la presente invención puede ser una proteína que contiene una secuencia de aminoácidos natural o una variante de la misma. En este caso, la "variante de la misma" significa una proteína o un péptido en el que varios aminoácidos de una secuencia de aminoácidos del "receptor de FCN" se han sustituido o una secuencia de aminoácidos parcial de la misma, que tiene una actividad de unión a FCN y que inhibe la unión entre FCN y un receptor de FCN.
- El aptámero de la presente invención se une a FCN e inhibe la unión de FCN y un receptor de FCN. Si el aptámero inhibe o no la unión de FCN a un receptor de FCN se puede evaluar, por ejemplo, mediante el siguiente ensayo.
- Para la medición, se emplea BIAcore2000 fabricado por BIAcore. Sobre un chip sensor CM5 se inmoviliza una proteína de fusión de receptor de FCN y Fc (por ejemplo, Trk A-Fc (175-TK, R&D Systems) o p75-Fc (R&D Systems). La cantidad que se va a inmovilizar es de 500 a 700 UR. FCN (0,1 μ M) y un aptámero (0,2 μ M) se mezclan en un tampón fisiológico (solución A: véase más abajo en el Ejemplo 2 mencionado), y se prepara una mezcla que va a ser una muestra, durante 30 min. Esta mezcla se inyecta en BIAcore2000, y se detecta la unión de FCN a un receptor de FCN.
- Cuando la actividad inhibitoria (%) no es menor que el 90%, el aptámero se evalúa para estudiar la inhibición de la unión entre FCN y el receptor de FCN. La actividad inhibitoria (%) se calcula siendo 0 la cantidad de unión entre el receptor de FCN y FCN, excluyendo el aptámero, y siendo 100 una cantidad de unión mediante la inyección de una solución exenta de FCN. En este caso, la cantidad de unión significa el valor de UR en un pico máximo del sensorgrama de BIAcore (valor de UR inmediatamente después de la finalización de la inyección de FCN).
- En una realización, el aptámero de la presente invención puede inhibir tanto la unión de FCN y TrkA, como la de FCN y p75.
- El aptámero de la presente invención puede mostrar una actividad inhibitoria frente a FCN obtenido a partir de cualquier mamífero. Tales mamíferos incluyen primates (por ejemplo, ser humano, mono), roedores (por ejemplo, ratón, rata y cobaya), y animales de compañía, animales domésticos y animales de trabajo (por ejemplo, perro, gato, caballo, vaca, cabra, oveja, cerdo).
- El aptámero de la presente descripción no está particularmente limitado en su longitud, siempre que se una a cualquier porción de FCN y pueda inhibir la unión de FCN a un receptor de FCN.
- El aptámero de la presente descripción comprende la secuencia representada por UGAAARAAACC (SEQ ID NO: 64) o CGAAMRAAACU (SEQ ID NO: 65). M en SEQ ID NO: 65 significa adenosina o citidina, y R en SEQ ID NOs: 64 y 65 significa guanosina o adenosina. Como la secuencia mostrada por SEQ ID NO: 64, UGAAAAAAACC (SEQ ID NO: 66) o UGAAAGAAACC (SEQ ID NO: 67) se pueden citar como un ejemplo. Como la secuencia mostrada por SEQ ID NO: 65, CGAACAAAACU (SEQ ID NO: 68) o CGAAAGAAACU (SEQ ID NO: 69) se pueden citar como un ejemplo.
- Estas secuencias pueden tener la modificación mencionada a continuación.
- El aptámero de la presente invención tiene típicamente una longitud de bases que no es superior a 73.
- Puesto que un aptámero de 74 nucleótidos o más tiene una longitud de cadena larga, frecuentemente es difícil aplicarlo para uso como producto farmacéutico. En otras palabras, cuando el número total de nucleótidos es menor que 73, la síntesis química y la producción en masa del aptámero será más fácil, y esto es una gran ventaja en términos de costes. También se cree que una modificación química es más fácil, la estabilidad en el cuerpo es mayor y la toxicidad menor.
- Desde el punto de vista de una aplicación a un uso como producto farmacéutico, el aptámero de la presente invención tiene de manera más deseable una longitud de bases menor que 73 nucleótidos, preferiblemente no superior a 70 nucleótidos, aún más preferiblemente no superior a 50 nucleótidos, lo más preferiblemente no superior a 45 nucleótidos. Por otro lado, cuando el número total de nucleótidos de la región del "ácido nucleico" es demasiado bajo, el aptámero puede que no sea capaz de unirse a FCN para inhibir la unión de FCN a un receptor de FCN. Un número mínimo apropiado de nucleótidos puede ser determinado de forma adecuada por los expertos ordinarios en la

técnica, de acuerdo con el objeto.

Además, el aptámero de la presente invención puede ser un aptámero que se une a FCN y/o que inhibe la unión de FCN a un receptor de FCN, inhibiendo de esta manera una actividad de crecimiento de neuritas o una actividad de proliferación celular de FCN. Si el aptámero de la presente invención puede inhibir la actividad de crecimiento de neuritas de FCN, se puede evaluar mediante el ensayo descrito en el Ejemplo 3. Además, si el aptámero de la presente invención puede inhibir la actividad de proliferación celular de FCN, se puede evaluar mediante el ensayo descrito en el Ejemplo 4.

La concentración del aptámero de la presente invención con la que la actividad de crecimiento de neuritas de FCN o la actividad de proliferación celular de FCN es del 50% (CI50; concentración inhibitoria del 50%) es preferiblemente no superior a 10 nM, más preferiblemente no superior a 1 nM.

Cada uno de los nucleótidos contenidos en el aptámero de la presente descripción es igual o diferente y puede ser un nucleótido que comprende un grupo hidroxilo en la posición 2' de la ribosa (por ejemplo, la ribosa de un nucleótido de pirimidina, la ribosa de un nucleótido de purina) (es decir, un nucleótido sin sustituir) o un nucleótido en el que un grupo hidroxilo se sustituye por cualquier átomo o grupo en la posición 2' de la ribosa. Como ejemplos de cualquier átomo o grupo de este tipo, se puede mencionar un nucleótido sustituido por un átomo de hidrógeno, un átomo de flúor o un grupo -O-alquilo (por ejemplo, un grupo -O-Me), un grupo -O-acilo (por ejemplo, un grupo -O-CHO) o un grupo amino (por ejemplo, un grupo -NH₂). En los casos siguientes, el grupo hidroxilo se sustituye por un átomo de hidrógeno, un átomo de flúor o un grupo -O-Me, respectivamente, en la posición 2' de la ribosa.



El aptámero de la presente descripción también puede ser el nucleótido en el que al menos un tipo (por ejemplo, 1, 2, 3 o 4 tipos) de nucleótidos comprende un grupo hidroxilo, o cualquier átomo o grupo descrito anteriormente, por ejemplo, al menos dos tipos (por ejemplo, 2, 3 o 4 tipos) de grupos seleccionados a partir 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.

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

Por otra parte, en los aptámeros de la presente descripción, todos los nucleótidos de purina son iguales o diferentes y cada uno puede ser un nucleótido sustituido por un grupo hidroxilo, o un nucleótido sustituido por cualquier átomo

o grupo mencionado anteriormente, preferiblemente un átomo o un grupo seleccionado a partir del grupo que consiste en un átomo de hidrógeno, un grupo metoxi y un átomo de flúor en la posición 2' de la ribosa.

5 Por otra parte, en los aptámeros de la presente descripción, todos los nucleótidos comprenden un grupo hidroxilo o cualquier átomo o grupo mencionado anteriormente, por ejemplo, el grupo idéntico seleccionado por el 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.

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

15 Cuando el uracilo se sustituye con timina en el aptámero de la presente invención, la actividad de unión a FCN, la actividad inhibitoria de la unión de FCN-receptor de FCN, la actividad inhibitoria del crecimiento neurítico de FCN, la actividad inhibitoria de la proliferación celular de FCN, la estabilidad, la capacidad de entrega de fármacos y la estabilidad en sangre del aptámero y similares, se puede incrementar.

20 Como alternativa, el aptámero de la presente invención está característicamente exento de actividad de unión a neurotrofina 3 (en lo sucesivo se indicará como NT-3). En este caso, estar exento de actividad de unión a NT-3 significa que la unión de cada proteína y el aptámero de la presente invención están por debajo del límite de detección en diversos ensayos de unión. Específicamente, significa, por ejemplo, que no se puede obtener una respuesta en un sensograma de resonancia de plasmón de superficie, que se puede medir por el método descrito en el Ejemplo 7.

25 Como alternativa, el aptámero de la presente descripción no inhibe característicamente la actividad de proliferación celular de una neurotrofina distinta de FCN. El aptámero de la presente invención no inhibe la actividad de proliferación celular del factor neurotrófico obtenido a partir del cerebro (en lo sucesivo se indicará como BDNF), de NT-3 y de la neurotrofina 4/5 (en lo sucesivo se indicará como NT-4/5). En este caso, si el aptámero inhibe la actividad de proliferación celular de otras neurotrofinas (BDNF, NT-3, NT-4/5) se puede evaluar por el ensayo descrito en el Ejemplo 7. Que la actividad de proliferación celular de BDNF, NT-3 o NT-4/5 no está inhibida significa, por ejemplo, que la concentración del aptámero de la presente invención que es necesaria para inhibir la proliferación celular de cada neurotrofina en un 50% (CI50; concentración inhibitoria del 50%) no es inferior a 100 nM, preferiblemente no es inferior a 300 nM, más preferiblemente no es inferior a 1000 nM, para BDNF y NT-3, y no es inferior a 100 nM, preferiblemente no es inferior a 300 nM, para NT-4/5.

Una realización más preferible del aptámero de la presente invención es un aptámero que no inhibe la actividad de proliferación celular de BDNF, NT-3 y NT-4/5.

35 En la presente memoria descriptiva, los términos BDNF, NT-3 y NT-4/5 significan BDNF, NT-3 y NT-4/5 de todas las especies de mamíferos incluyendo los seres humanos, respectivamente.

El aptámero de la presente descripción también puede ser:

(a) un aptámero que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada entre SEQ ID NOs: 1 - 54 (en donde uracilo puede ser timina);

40 (b) un aptámero que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada entre SEQ ID NOs: 1 - 54 (en donde uracilo puede ser timina), en la que uno a varios nucleótidos están sustituidos, delecionados, insertados o añadidos;

45 (c) un aptámero que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad del 70% o superior (preferiblemente del 80% o superior, más preferiblemente del 90% o superior, lo más preferiblemente del 95% o superior) con una secuencia de nucleótidos seleccionada entre SEQ ID NOs: 1 - 54 (en donde uracilo puede ser timina); o

(d) un conjugado seleccionado a partir del grupo que consiste en un conjugado de una pluralidad de aptámeros (a) anteriores, un conjugado de una pluralidad de aptámeros (b) anteriores, un conjugado de una pluralidad de aptámeros (c) anteriores, y un conjugado de una pluralidad de aptámeros (a), (b) y (c) anteriores.

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

Además, preferiblemente, los aptámeros de (b) - (d) mencionados anteriormente se unen a FCN e inhiben la unión entre FCN y un receptor de FCN, y/o se unen a FCN, e inhiben la actividad de crecimiento neurítico o la actividad de proliferación celular de FCN.

Más preferiblemente, los aptámeros de (b) - (d) mencionados anteriormente muestran una concentración inhibitoria de la actividad de proliferación celular o del crecimiento de neuritas de FCN que no es superior a 10 nM, más preferiblemente que no es superior a 1 nM.

5 En (b) anterior, el número de nucleótidos sustituidos, delecionados, insertados o añadidos no está particularmente limitado siempre que el aptámero se una a FCN, y pueda inhibir la actividad de FCN (actividad de unión con el receptor de FCN, etc.) y siempre que el número de nucleótidos del aptámero en sí no exceda a 73. Pueden ser, por ejemplo, no más de aproximadamente 30, preferiblemente no más de aproximadamente 20, más preferiblemente no más de aproximadamente 10, todavía más preferiblemente no más de 5, lo más preferiblemente 4, 3, 2 o 1.

10 Con respecto a (c) anterior, "una identidad" significa una proporción (%) de residuos nucleotídicos idénticos a todos los residuos de nucleótidos que se solapan en la alineación óptima, en la que 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 de las secuencias para obtener la mejor alineación).

15 La identidad de la secuencia de nucleótidos se puede calcular, por ejemplo, mediante la alineación de las dos secuencias de nucleótidos utilizando el algoritmo de cálculo de homología NCBI BLAST-2 (del inglés, National Center for Biotechnology Information Basic Local Alignment Search Tool) con las siguientes condiciones (apertura de hueco = 5 puntos de penalización; extensión de hueco = 2 puntos de penalización; x_ entrega (del inglés, "dropoff")= 50; valor esperado = 10; filtrado = ON).

20 En (d) anterior, la conjugación se puede lograr mediante la unión en tándem. En la conjugación, se puede utilizar un enlazador. Como enlazador se pueden mencionar cadenas de nucleótidos (por ejemplo, de 1 a aproximadamente 20 nucleótidos) y cadenas no nucleotídicas (por ejemplo, $-(CH_2)_n$ -enlazador, $-(CH_2CH_2O)_n$ -enlazador, enlazador de hexaetilenglicol, enlazador TEG, enlazador que contiene péptido, enlazador que contiene un enlace -S-S-, enlazador que contiene un enlace -CONH-, enlazador que contiene un enlace -OPO₃-). La pluralidad tal como se ha mencionado en el conjugado descrito anteriormente, de una pluralidad de los mismos no está particularmente limitada, siempre que sean dos o más, y la pluralidad puede ser, por ejemplo, 2, 3 o 4. Cada uno de los nucleótidos de (a) a (d) anteriores, tanto si son iguales como diferentes, puede ser un nucleótido que comprende un grupo hidroxilo en la posición 2' de la ribosa (por ejemplo, ribosa de un nucleótido de pirimidina), o un nucleótido en el que un grupo hidroxilo está sustituido por cualquier grupo (por ejemplo, un átomo de hidrógeno, un átomo de flúor o un grupo -O-Me) en la posición 2' de la ribosa.

30 El aptámero de la presente descripción puede ser uno en el que un residuo de azúcar (por ejemplo, ribosa) de cada nucleótido se ha modificado para aumentar la actividad de unión a FCN, la actividad inhibitoria de la unión de FCN-receptor de FCN, la actividad inhibitoria del crecimiento de neuritas de FCN, la actividad inhibitoria de la proliferación celular de FCN, la estabilidad, la capacidad de entrega de fármacos y la estabilidad en sangre del aptámero y similares. Ejemplos de la modificación en un residuo de azúcar incluyen la sustitución de un átomo de oxígeno en la posición 2', la posición 3' y/o la posición 4' del residuo de azúcar por otro átomo, y similares. Como tipo de modificación se puede mencionar la fluoración, la O-alkilación (por ejemplo, O-metilación, O-etilación), la O-arilación, la S-alkilación (por ejemplo, S-metilación, S-etilación), la S-arilación y la aminación (por ejemplo, -NH₂). Además, ejemplos de las mismas incluyen 4'-SRNA en donde el oxígeno de la posición 4' se sustituye por azufre, LNA en donde la posición 2' y la posición 4' se reticular a través de metileno (ácido nucleico bloqueado), ácido nucleico 3'-N-fosforamidado en donde el grupo hidroxilo en la posición 3' se sustituye por un grupo amino y similares. Tales alteraciones en el residuo de azúcar se pueden realizar con un método conocido por sí mismo (véase, 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).

45 El aptámero de la presente invención también puede tener una base del ácido nucleico (por ejemplo, purina o pirimidina) alterada (por ejemplo, una sustitución química) para aumentar la actividad de unión a FCN, la actividad inhibitoria de la unión de FCN-receptor de FCN, la actividad inhibitoria de crecimiento de neuritas de FCN, la actividad inhibitoria de la proliferación celular de FCN, la estabilidad, la capacidad de entrega de fármacos y la estabilidad en la sangre del aptámero y similares. Como ejemplos de tales alteraciones, se puede mencionar la alteración de pirimidina en la posición 5, la alteración de purina en la posición 6 y/o 8 (modificación con O-metilo y similares), 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 descripción se puede alterar para conferir resistencia a la nucleasa y la hidrólisis. Por ejemplo, la región del fosfato del aptámero se puede reemplazar por P (O) S (tioato), P (S) S (ditioato), P (O) NR₂ (amidato), P (O) R, P (O) OR', CO o CH₂ (formacetal), P (o) BH₃ (boranofosfato) o 3'-amina (-NH-CH₂-CH₂-) [en donde cada unidad de R o R' es independientemente H o un alquilo sustituido o no sustituido (por ejemplo, metilo, etilo)].

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

Las alteraciones también pueden incluir alteraciones tales como la terminación de cadena en 3' y 5'.

Se puede realizar una alteración adicional mediante la adición en un extremo de un polietilenglicol (en lo sucesivo, a

veces se describe como "PEG"), aminoácido, péptido, dT invertida, miristoílo, litocólico-oleílo, docosanilo, lauroílo, estearoílo, palmitoílo, oleoílo, linoleoílo, otros lípidos, esteroides, colesterol, cafeína, vitaminas, pigmentos, sustancias fluorescentes, agente anticancerígeno, toxina, enzimas, sustancia radiactiva, biotina y similares. Para tales alteraciones, véanse, por ejemplo, los documentos de patentes US 5.660.985 y 5.756.703.

- 5 En particular, cuando la alteración se lleva a cabo mediante la adición terminal de PEG, el peso molecular de PEG no está particularmente limitado, y es preferiblemente de 1000 hasta 100.000, más preferiblemente de 30.000 - 90.000. El PEG puede ser lineal o ramificado en dos o más cadenas (PEG multibrazo).

Un PEG de este tipo no está particularmente limitado, y los expertos en la técnica apropiada pueden seleccionar y utilizar de forma adecuada los PEGs comercializados o conocidos (por ejemplo, <http://www.peg-drug.com/peg-product/branched.html>). Ejemplos preferibles específicos del PEG que se va a aplicar para el aptámero de la presente invención, incluyen PEG de tipo GS con 2 ramificaciones que tiene un peso molecular de 40.000 (SUNBRIGHT GL2-400GS2 fabricado por NOF CORPORATION), PEG de tipo TS con 2 ramificaciones que tiene un peso molecular de 40.000 (SUNBRIGHT GL2-400TS fabricado por NOF CORPORATION), PEG de tipo TS con 4 ramificaciones que tiene un peso molecular de 40.000 (SUNBRIGHT GL4-400TS fabricado por NOF CORPORATION), PEG de tipo TS con 2 ramificaciones que tiene un peso molecular de 80.000 (SUNBRIGHT GL2-800TS fabricado por NOF CORPORATION), PEG de tipo TS con 4 ramificaciones que tiene un peso molecular de 80.000 (SUNBRIGHT GL4-800TS fabricado por NOF Corporation) y similares.

En este caso, en el aptámero de la presente invención, el PEG se puede añadir directamente al extremo terminal. Es más preferible que se añada un enlazador que tiene un grupo que se puede unir a PEG y a similares, al extremo terminal del mismo, y el PEG se añade al aptámero de la presente invención a través del enlazador.

El enlazador para PEG y el aptámero de la presente invención no están particularmente limitados, y el número de carbonos de la cadena, el grupo funcional y similares se pueden seleccionar apropiadamente de acuerdo con el sitio de unión, el tipo de PEG y similares. Ejemplos de un enlazador de este tipo incluyen un enlazador que tiene un grupo amino. En concreto, cuando se añade al extremo 5' terminal, se puede mencionar un enlazador ssH (SAFC) o DMS (O) MT-AMINO-MODIFIER (), y cuando se añade al extremo 3' terminal, se puede mencionar TFA Amino C-6 Icaa CPG (ChemGenes) y similares. Cuando se selecciona este enlazador se añade, por ejemplo, un grupo activo de N-hidroxisuccinimida al PEG, y se hace reaccionar con un grupo amino en el lado del enlazador, por lo que el aptámero de la presente invención se puede unir a PEG a través del enlazador.

Como PEG y enlazador, se pueden utilizar preferentemente productos disponibles comercialmente. Las condiciones de la reacción y similares con respecto a la unión de PEG, un enlazador y el aptámero de la presente invención, las pueden determinar apropiadamente los expertos ordinarios en la técnica.

El aptámero de la presente invención se puede sintetizar químicamente tal y como se describe en esta memoria y por un método conocido de por sí en la técnica. Un aptámero se une a la molécula diana a través de 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 basados en las bases de ácidos nucleicos. En particular, los enlaces iónicos basados en la carga negativa del grupo fosfato, que están presentes en la misma cantidad que el número de nucleótidos constituyentes, son fuertes, y se unen a la carga positiva de la lisina y la arginina presente en la superficie de la proteína. Por esta razón, las bases de ácidos nucleicos que no participan en la unión directa a la sustancia diana, se pueden sustituir. En particular, debido a que la región de estructura de tallo ya ha formado parejas de bases y se enfrenta a la parte interior de la estructura de doble hélice, es poco probable que las bases de ácidos nucleicos se unan directamente a la sustancia diana. Por lo tanto, incluso cuando un par de bases es sustituido por otro par de bases, la actividad del aptámero frecuentemente no disminuye. En estructuras en las que no se forman pares de bases, tales como estructuras de bucle, siempre que la base de ácido nucleico no esté implicada en la unión directa a la molécula diana, es posible la sustitución de bases. 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 se puede sustituir por otra molécula modificada. Por lo tanto, un aptámero, a menos que el grupo funcional implicado en la unión directa a la molécula diana esté sustituido o eliminado, conserva frecuentemente su actividad. También es importante que la estructura tridimensional general no cambie sustancialmente.

Un aptámero se puede preparar mediante la utilización del método SELEX o una versión mejorada del mismo (por ejemplo, Ellington et al., (1990) Nature, 346, 818-82; Tuerk et al., (1990) Science, 249, 505-510). En el método SELEX, al incrementar el número de rondas o al utilizar una sustancia competidora, un aptámero que presenta un potencial de unión más fuerte con la molécula diana, se concentra y se selecciona. Por lo tanto, ajustando el número de rondas de SELEX y/o cambiando el estado competitivo, los aptámeros con diferentes fuerzas de unión, los aptámeros con diferentes modos de unión y los aptámeros con la misma fuerza de unión o modo de unión, pero diferentes secuencias de bases, se pueden obtener en algunos casos. El método SELEX comprende un procedimiento de amplificación por PCR; causando 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 mediante SELEX son ácidos nucleicos que muestran una alta afinidad hacia la sustancia

diana, pero esto no significa la unión a un sitio activo de la sustancia diana. Por lo tanto, los aptámeros obtenidos mediante SELEX no actúan necesariamente sobre la función de la sustancia diana. El FCN es una proteína básica, y se piensa que es probable que permita que los ácidos nucleicos se unan a la misma de forma no específica. Un aptámero que no se une a un sitio activo no influye en la actividad de la sustancia diana. De hecho, el ARN utilizado como control, no inhibía la unión entre FCN y un receptor de FCN.

Basándose en un aptámero activo seleccionado de este modo, el SELEX se puede realizar basándose en la secuencia del aptámero obtenido para adquirir un aptámero que posea una actividad superior. Específicamente, después de preparar un molde en el que un aptámero con una secuencia determinada se aleatoriza parcialmente o un molde dopado con aproximadamente 10 a 30% de secuencias aleatorias, el SELEX se realiza de nuevo.

Un aptámero obtenido mediante SELEX tiene una longitud de aproximadamente 80 nucleótidos, y es difícil de preparar como medicamento tal como es. Por lo tanto, es necesario repetir intentos de prueba y error para acortar el aptámero hasta una longitud de 73 nucleótidos o menor, lo que permite una síntesis química sencilla, preferiblemente 70 nucleótidos o menos, más preferiblemente 60 nucleótidos o menos, aún más preferiblemente 50 nucleótidos o menos, lo más preferiblemente 45 nucleótidos o menos. Dependiendo del diseño del cebador para un aptámero obtenidos por SELEX, varía el esfuerzo de la operación de minimización posterior. A menos que el cebador se diseñe con éxito, el desarrollo posterior será imposible, incluso si un aptámero con actividad es seleccionado por SELEX. En este documento se obtuvo un aptámero que conservaba la actividad incluso con 43 nucleótidos.

Los aptámeros se alteran fácilmente, ya que permiten una síntesis química. Para los aptámeros, mediante la predicción de la estructura secundaria mediante el programa MFOLD, o mediante la predicción de la estructura estérica por análisis de rayos X o análisis de RMN, es posible predecir en cierta medida qué nucleótido se puede sustituir o eliminar, y dónde insertar un nuevo nucleótido. Un aptámero previsto con la nueva secuencia se puede sintetizar fácilmente de forma química, y se puede determinar si el aptámero conserva o no la actividad usando un sistema de ensayo existente.

Si una región importante para la unión del aptámero obtenido con la sustancia diana, se identifica mediante intentos de prueba y error repetidos, tal y 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. Tal longitud de la nueva secuencia no está particularmente limitada.

En particular, las secuencias mencionadas anteriormente mostradas por UGAAARAAACC (SEQ ID NO: 64) y CGAAMRAAACU (SEQ ID NO: 65) son porciones importantes para la unión del aptámero de la presente descripción a FCN y para la inhibición de la unión entre FCN y un receptor de FCN. Incluso cuando se añade una nueva secuencia a ambos extremos de estas secuencias, la actividad se mantiene inalterada en muchos casos. Estas secuencias pueden tener las modificaciones mencionadas anteriormente.

Modificaciones, tales como secuencias, proporcionan una amplia gama de diseños o alteraciones.

Como se ha indicado anteriormente, los aptámeros permiten una amplia gama de diseños o alteraciones. La presente descripción también proporciona un método de producción de aptámeros que permite una amplia gama de diseños o la alteración de un aptámero que comprende una secuencia especificada (por ejemplo, una secuencia correspondiente a una porción seleccionada entre regiones del tallo, regiones del bucle interno, regiones de bucle en horquilla y regiones monocatenarias: en adelante, abreviada como secuencia fija según sea necesario).

Por ejemplo, el método de producción de un aptámero de este tipo incluye la producción de un aptámero que comprende una secuencia fija mediante el uso de un solo tipo de molécula de ácido nucleico que consiste en una secuencia de nucleótidos mostrada por:

Secuencia del cebador (i) - (N) a - secuencia fija - (N) b - Secuencia del 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 que consiste en "b" unidades de N; cada una de las unidades de N, ya sean idénticas o diferentes, es un nucleótido seleccionado a partir del grupo que consiste en A, G, C y T (preferiblemente, A, G, C y U). Cada uno de "a" y "b", ya sea idénticos o diferentes, pueden ser cualquier número, y pueden ser, por ejemplo, desde 1 a aproximadamente 100, preferiblemente desde 1 a aproximadamente 50, más preferiblemente desde 1 a aproximadamente 30, todavía más preferiblemente desde 1 a aproximadamente 20 o desde 1 a aproximadamente 10], o una pluralidad de tipos de moléculas de ácido nucleico (por ejemplo, una genoteca de moléculas de ácido nucleico diferentes en el número de a, b, etc.) y parejas de cebadores correspondientes a las secuencias de cebadores (i) y (ii), respectivamente.

El aptámero de la presente descripción es, preferentemente, un aptámero que se une a FCN, que contiene característicamente la secuencia mostrada por SEQ ID NO: 26, y que tiene una longitud de bases que no es superior a 73.

La secuencia mostrada por SEQ ID NO: 26 es una región importante para el aptámero de la presente invención para actuar como el aptámero de la presente invención, como la unión a FCN, inhibición de la unión de FCN a un receptor de FCN y similares. Incluso cuando se añade una nueva secuencia a ambos extremos de la secuencia, la función

del aptámero de la presente descripción no se ve afectada. La secuencia puede estar sujeta a una modificación del residuo de azúcar mencionado anteriormente, a una alteración de la base de ácido nucleico y el grupo fosfato, y similares.

5 Por lo tanto, ejemplos específicos preferibles del aptámero de la presente descripción incluyen aptámeros que comprenden la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 26 que tienen una longitud de bases que no es superior a 73, y que se unen a FCN, los cuales son

(i) un aptámero que comprende al menos un tipo de nucleótido en el que el grupo hidroxilo se sustituye por un átomo de hidrógeno, un átomo de flúor, un grupo -O-alquilo, un grupo -O-acilo o un grupo amino en la posición 2' de la ribosa;

10 (ii) un aptámero en el que PEG, aminoácido, péptido, dT invertida, miristoílo, litocólico-oleílo, docosanilo, lauroílo, estearoílo, palmitoílo, oleoílo, linoleoílo, otros lípidos, esteroides, colesterol, cafeína, vitaminas, pigmentos, una sustancia fluorescente, un agente anticancerígeno, una toxina, una enzima o una sustancia radiactiva o biotina se añaden al extremo terminal;

(iii) un aptámero que satisface los requisitos de (i) y (ii);

15 y similares.

La presente descripción también proporciona un aptámero con sustancia hidrófoba añadida que se une a FCN (en lo sucesivo se indicará como "un aptámero con sustancia hidrófoba añadida de la presente descripción").

20 En la presente memoria descriptiva, el aptámero con sustancia hidrófoba añadida es un aptámero unido a una sustancia hidrófoba. Es decir, el aptámero con sustancia hidrófoba añadida de la presente descripción es una sustancia en la que una región de "aptámero" y una región de "sustancia hidrófoba" están ligadas. La región de "aptámero" y la región de "sustancia hidrófoba" pueden estar unidas por una región "enlazadora".

25 La región de "aptámero" del aptámero con sustancia hidrófoba añadida de la presente descripción es tal y como se ha explicado anteriormente para "el aptámero de la presente descripción". Por lo tanto, el tipo de nucleótidos que constituyen la región de aptámero no está particularmente limitado, siempre que el aptámero con sustancia hidrófoba añadida se una a FCN. Es decir, siempre que se cumplan las condiciones anteriores, puede ser cualquiera de los nucleótidos conocidos por sí mismos, tales como ADN, ARN y similares, ácido nucleico modificado y una mezcla de los mismos, y una cadena doble o una cadena sencilla. Además, la secuencia de nucleótidos por sí misma no está particularmente limitada. Salvo que se especifique particularmente, el "ácido nucleico modificado" mencionado anteriormente se refiere a un "nucleótido sustituido (modificado) en una posición sustituible" mostrado a continuación.

30 Como alternativa, el aptámero con sustancia hidrófoba añadida de la presente descripción puede ser un aptámero con sustancia hidrófoba añadida que se une a FCN para inhibir la unión de FCN a un receptor de FCN. Si el aptámero con sustancia hidrófoba añadida de la presente descripción inhibe la unión de FCN a un receptor de FCN, se puede evaluar mediante el ensayo en "el aptámero de la presente invención" anterior o mediante el ensayo descrito en el Ejemplo 2.

35 El aptámero con sustancia hidrófoba añadida de la presente descripción puede ser un aptámero con sustancia hidrófoba añadida que se une a FCN para inhibir la actividad de crecimiento de neuritas de FCN o la actividad de proliferación celular de FCN. Si el aptámero con sustancia hidrófoba añadida de la presente descripción inhibe la actividad de crecimiento neurítico de FCN se puede evaluar por el ensayo en "el aptámero de la presente invención" anterior o por el ensayo descrito en el Ejemplo 3. Si el aptámero con sustancia hidrófoba añadida de la presente invención inhibe la actividad de proliferación celular de FCN se puede evaluar por el ensayo en "el aptámero de la presente invención" anterior o por el ensayo descrito en el Ejemplo 4.

La concentración del aptámero con sustancia hidrófoba añadida de la presente descripción a la que la actividad de crecimiento de neuritas de FCN o la actividad de proliferación celular de FCN es del 50% (CI50; 50% de concentración inhibitoria) es preferiblemente no superior a 10 nM, más preferiblemente no superior a 3 nM.

45 El nucleótido contenido en el aptámero con sustancia hidrófoba añadida de la presente descripción puede ser, al igual que el aptámero de la presente descripción, un nucleótido que comprende un grupo hidroxilo en la posición 2' de la ribosa (es decir, un nucleótido no sustituido) o un nucleótido en el que un grupo hidroxilo se sustituye por cualquier átomo o grupo en la posición 2' de la ribosa. Ejemplos de ese tipo de átomo o grupo incluyen átomos y grupos similares a los indicados para el aptámero de la presente descripción.

50 Aunque la longitud de las bases de la región de "aptámero" del aptámero con sustancia hidrófoba añadida de la presente descripción no está particularmente limitada, siempre que el aptámero con sustancia hidrófoba añadida se una a FCN e inhiba la unión de FCN a un receptor de FCN, es deseablemente no superior a 73 nucleótidos (cuando el extremo 5' terminal o 3' terminal se modifica con dT invertida, esto no se cuenta como la longitud de las bases).

Puesto que un aptámero con sustancia hidrófoba añadida de 74 nucleótidos o superior tiene una longitud de cadena

larga, frecuentemente es difícil su aplicación para uso como producto farmacéutico. En otras palabras, cuando el número total de nucleótidos es menor que 73, la síntesis química y la producción en masa del aptámero será más fácil, y existe una gran ventaja en términos de costes. También se cree que una modificación química es más fácil, la estabilidad en el cuerpo es más alta y la toxicidad es menor.

- 5 Desde el punto de vista de la aplicación a un uso como producto farmacéutico, el aptámero con sustancia hidrófoba añadida de la presente descripción tiene de manera más deseable una longitud de bases menor de 73 nucleótidos, preferiblemente no superior a 70 nucleótidos, aún más preferiblemente no superior a 50 nucleótidos, lo más preferiblemente no superior a 45 nucleótidos. Por otro lado, cuando el número total de nucleótidos de la región de "ácido nucleico" es demasiado bajo, el aptámero puede no ser capaz de unirse a FCN para inhibir la unión de FCN a un receptor de FCN. Un número mínimo apropiado de nucleótidos puede ser determinado apropiadamente por los expertos ordinarios en la técnica, de acuerdo con el objeto.

- 10 El nucleótido que constituye la región de "aptámero" puede estar sustituido (modificado) de cualquier manera en cualquier posición sustituible, siempre que el aptámero con sustancia hidrófoba añadida se una a FCN e inhiba la unión de FCN a un receptor de FCN. Puede ser un nucleótido no sustituido (modificado) en absoluto. Cuando está sustituido (modificado), la "posición sustituible" está clara para los expertos ordinarios en la técnica y se puede seleccionar un sustituyente conocido por sí mismo.

- 15 De los nucleótidos que constituyen la región de "aptámero", el nucleótido sustituido (modificado) en una posición sustituible (a veces indicada como un ácido nucleico modificado en la presente memoria descriptiva) es preferiblemente un nucleótido en el que la posición 2' de la ribosa (por ejemplo, la ribosa del nucleótido de pirimidina) es un grupo hidroxilo (es decir, nucleótidos no sustituidos), o un nucleótido en el que el grupo hidroxilo se sustituye en la posición 2' de la ribosa con cualquier átomo o sustituyente igual o diferente.

Ejemplos del átomo o sustituyente mencionado anteriormente incluyen un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno (por ejemplo, un átomo de flúor), un grupo -O-alcilo (por ejemplo, un grupo -O-Me), un grupo -O-acilo (por ejemplo, un grupo -O-CHO), un grupo amino (por ejemplo, un grupo -NH₂) y similares.

- 20 En esta memoria descriptiva, los nucleótidos que constituyen el aptámero con sustancia hidrófoba añadida se supone que son ARNs (es decir, los grupos de azúcar se supone que son ribosas) para describir cómo los grupos de azúcar se modifican en los nucleótidos. Sin embargo, esto no quiere decir que el ADN esté exento de los nucleótidos que constituyen el aptámero con sustancia hidrófoba añadida, y una modificación del ARN se debe entender como una modificación del ADN según sea apropiada. Cuando el nucleótido que constituye el aptámero es ADN, por ejemplo, la sustitución del grupo hidroxilo en la posición 2' de la ribosa por X, se debe entender como una sustitución de un átomo de hidrógeno en la posición 2' de la desoxirribosa por X.

- 25 Cuando el uracilo se sustituye por timina en el aptámero con sustancia hidrófoba añadida de la presente descripción, la actividad de unión a FCN, la actividad inhibitoria de la unión entre FCN-receptor de FCN, la actividad inhibitoria del crecimiento de neuritas de FCN, la actividad inhibitoria de la proliferación celular de FCN, la estabilidad, la capacidad de entrega de fármacos y la estabilidad en sangre del aptámero y similares, se puede incrementar.

El aptámero con sustancia hidrófoba añadida de la presente descripción también puede ser:

- (a) un aptámero con sustancia hidrófoba añadida que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada entre SEQ ID NOs: 55 - 63 (en donde uracilo puede ser timina);
- 40 (b) un aptámero con sustancia hidrófoba añadida que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada entre SEQ ID NOs: 55 - 63 (en donde uracilo puede ser timina), en la que uno a varios nucleótidos están sustituidos, deletados, insertados o añadidos;
- (c) un aptámero con sustancia hidrófoba añadida que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad del 70% o superior (preferiblemente del 80% o superior, más preferiblemente del 90% o superior, lo más preferiblemente del 95% o superior) con una secuencia de nucleótidos seleccionada entre SEQ ID NOs: 55 - 63 (en donde uracilo puede ser timina); o
- 45 (d) un conjugado seleccionado a partir del grupo que consiste en un conjugado de una pluralidad de aptámeros (a') anteriores, un conjugado de una pluralidad de aptámeros (b') anteriores, un conjugado de una pluralidad de aptámeros (c') anteriores, y un conjugado de una pluralidad de aptámeros (a'), (b') y (c') anteriores.

- 50 Los aptámeros de los (b') - (d') mencionados anteriormente o un conjugado se pueden unir a FCN y/o inhibir la actividad de FCN (actividad de unión al receptor de FCN, etc.).

Además, preferiblemente, los aptámeros de (b') - (d') mencionados anteriormente o un conjugado se une a FCN e inhibe la unión de FCN y un receptor de FCN, y/o se une a FCN e inhibe la actividad de crecimiento neurítico de FCN.

Más preferiblemente, los aptámeros de los (b') - (d') mencionados anteriormente o un conjugado muestran una acti-

vidad inhibitoria de la actividad de crecimiento de neuritas o de la actividad proliferación celular de FCN que no es superior a 10 nM, más preferiblemente no superior a 3 nM.

5 En (b') anterior, el número de nucleótidos sustituidos, delecionados, insertados o añadidos no está particularmente limitado siempre que el aptámero se una a FCN, y pueda inhibir la actividad de FCN (actividad de unión al receptor de FCN, etc.) y que el número de nucleótidos del aptámero en sí no exceda a 73. Pueden ser, por ejemplo, no más de aproximadamente 30, preferiblemente no más de aproximadamente 20, más preferiblemente no más de aproximadamente 10, todavía más preferiblemente no más de 5, lo más preferiblemente 4, 3, 2 o 1.

10 En (d') anterior, la conjugación se puede lograr mediante la unión en tándem. En la conjugación, se puede utilizar un enlazador. Como enlazador se pueden mencionar cadenas de nucleótidos (por ejemplo, de 1 a aproximadamente 20 nucleótidos) y cadenas no nucleotídicas (por ejemplo, enlazador $-(CH_2)_n-$, enlazador $-(CH_2CH_2O)_n-$, enlazador de hexaetilenglicol, enlazador TEG, enlazador que contiene péptido, enlazador que contiene un enlace -S-S-, enlazador que contiene un enlace -CONH-, enlazador que contiene un enlace $-OPO_3-$). La pluralidad como se ha mencionado en el conjugado descrito anteriormente, de una pluralidad de los mismos no está particularmente limitada, siempre que sean dos o más, y la pluralidad puede ser, por ejemplo, 2, 3 o 4. Cada uno de los nucleótidos de (a') a (d') anteriores, tanto si son iguales como diferentes, puede ser un nucleótido que comprende un grupo hidroxilo en la posición 2' de la ribosa (por ejemplo, ribosa de un nucleótido de pirimidina), o un nucleótido en el que un grupo hidroxilo se sustituye por cualquier grupo (por ejemplo, un átomo de hidrógeno, un átomo de flúor o un grupo -O-Me) en la posición 2' de la ribosa.

20 La región de "residuo de azúcar", la región de "base de ácido nucleico" y la región de "grupo fosfato", así como una sustitución (modificación), alteración y similares de las mismas en el aptámero con sustancia hidrófoba añadida de la presente descripción, son similares a las descritas para el aptámero de la presente descripción.

25 En el aptámero con sustancia hidrófoba añadida de la presente descripción, además se puede llevar a cabo una alteración añadiendo a un extremo PEG, aminoácido, péptido, dT invertida, miristoílo, litocólico-oleílo, docosaniolo, lauroílo, estearoílo, palmitoílo, oleoílo, linoleoílo, otros lípidos, esteroides, colesterol, cafeína, vitaminas, pigmentos, sustancias fluorescentes, agente anticancerígeno, toxina, enzimas, sustancia radiactiva, biotina y similares. La alteración mencionada anteriormente se puede manejar de la misma manera que en el aptámero de la presente descripción.

30 La sustancia que constituye la región de "sustancia hidrófoba" del aptámero con sustancia hidrófoba añadida de la presente descripción, se puede sustituir (modificar) de cualquier manera en cualquier posición sustituible, siempre que el aptámero con sustancia hidrófoba añadida se una a FCN e inhiba la unión de FCN a un receptor de FCN. La "posición sustituible" está clara para los expertos ordinarios en la técnica y pueden seleccionar un sustituyente conocido por sí mismo.

35 Cuando tal "sustancia hidrófoba" se une a un aptámero, la actividad de unión a FCN, la actividad inhibitoria de la unión de FCN-receptor de FCN, la actividad inhibitoria del crecimiento neurítico de FCN, la actividad inhibitoria de la proliferación celular de FCN, la estabilidad, la capacidad de entrega de fármacos y la estabilidad en sangre del aptámero y similares, se pueden incrementar.

En la presente memoria descriptiva, como "sustancia hidrófoba", se pueden mencionar específicamente los esteroides y vitaminas mencionados a continuación, los esteroides se pueden mencionar preferentemente y colesterol se pueden mencionar aún más preferiblemente.

40 En la presente memoria descriptiva, los "esteroides" significa un compuesto que tiene un esqueleto de ciclopentantrieno o un esqueleto resultante de una o varias escisiones de la unión del anillo, la expansión del anillo y la contracción del anillo del mismo, como esqueleto básico, en donde la totalidad o una parte del mismo está hidrogenado. Como esteroides se pueden mencionar específicamente, estrofantidina, colestanol, hormona esteroidea (estradiol, testosterona, progesterona, cortisol, cortisona, aldosterona, corticosterona, desoxicorticosterona y similares), y similares. Pueden ser vitaminas conocidas, específicamente vitamina A, vitamina D, vitamina E, vitamina K y similares.

En la presente memoria descriptiva, los "esteroides" significa un compuesto en el que la posición C-3 del anillo A en el esqueleto de ciclopentantrieno de los esteroides, está hidroxilada o carbonilada. Como esteroides, se pueden mencionar específicamente hormona esteroide, campesterol, sitosterol, estigmasterol, ergosterol y similares.

50 En la presente memoria descriptiva, los "colesteroles" significa un esteroide de origen animal, que incluye no solo el colesterol, sino también colesterol hidrogenado, y uno derivatizado mediante una reacción de esterificación. Como tal derivado de colesterol, se puede mencionar dihidrocolesterol hidrogenado, y éster con ácido graso inferior o superior. El hidroxiestearato de colesterilo, oleato de colesterilo, isoestearato de colesterilo, lanolato de colesterilo, macadamato de colesterilo, nonanoato de colesterilo, estearato de colesterilo, butirato de colesterilo y similares están disponibles comercialmente.

55 El aptámero con sustancia hidrófoba añadida de la presente descripción puede tener una región de "aptámero" unida directamente a una región de "sustancia hidrófoba", o una región de "aptámero" unida a una región de "sustancia hidrófoba" a través de una región "enlazadora". Los expertos en la técnica pueden unir una región de "aptámero" y

una región de "sustancia hidrófoba" a través de un método conocido.

En el aptámero con sustancia hidrófoba añadida de la presente descripción, la región "enlazadora" capaz de unir una región de "aptámero" a una región de "sustancia hidrófoba", no está particularmente limitada siempre que un aptámero con sustancia hidrófoba añadida se pueda unir a FCN e inhibir la unión de FCN a un receptor de FCN, y los expertos ordinarios en la técnica pueden determinar apropiadamente tal enlazador.

Ejemplos de tal enlazador incluyen una cadena de hidrocarburo saturado (por ejemplo, una cadena de hidrocarburo saturado que tiene un número de carbonos igual a 12), una cadena de nucleótidos (por ejemplo, de 1 a aproximadamente 20 nucleótidos), una cadena no nucleotídica (por ejemplo, enlazador $-(CH_2)_n$, enlazador que contiene péptido (por ejemplo, -Gly-Cys-), enlazador que contiene un enlace -S-S- (por ejemplo, $-(CH_2)_m-S-S-(CH_2)_n$), enlazador que contiene un enlace -CONH- (por ejemplo, $-(CH_2)_m-CONH-(CH_2)_n$), enlazador que contiene un enlace -O-PO₃⁻ (por ejemplo, $-(CH_2)_m-O-PO_2-O-(CH_2)_n$), enlazador de polietilenglicol (por ejemplo, enlazador de hexaetilenglicol) y similares (m y n en cada enlazador significan cualquier número entero).

La región enlazadora mencionada anteriormente puede estar ramificada y se puede haber añadido una molécula funcional tal como un grupo dimetoxitritilo (DMT), sustancia fluorescente y similares (estas moléculas funcionales se retiran finalmente en algunos casos). Además, las moléculas pueden ser péptidos que pueden ser reconocidos y escindidos por enzimas tales como trombina, metaloproteinasa matricial (MMP) y Factor X, y pueden ser polinucleótidos que pueden ser escindidos por nucleasas o endonucleasas de restricción.

Ejemplos de la "cadena de hidrocarburo saturado" mencionada anteriormente incluyen los que tienen un número de carbonos igual a 3, 6, 12, 18 o 24. También puede estar ramificada.

Como "cadena de nucleótidos" mencionada anteriormente se puede mencionar un nucleótido que contiene un grupo hidroxilo en la posición 2' de la ribosa (por ejemplo, ribosa del nucleótido pirimidina), o un nucleótido en el que un grupo hidroxilo se sustituye (modifica) con cualquier grupo (por ejemplo, un átomo de hidrógeno, un átomo de flúor o un grupo -O-Me) en la posición 2' de la ribosa.

La unión de la región "enlazadora" y la región de "sustancia hidrófoba" no está particularmente limitada, y ambas regiones pueden estar unidas por un método conocido por los expertos normales en la técnica.

Además, la unión de la región "enlazadora" y la región de "aptámero" tampoco está particularmente limitada, y ambas regiones pueden estar unidas por un método conocido por los expertos normales en la técnica.

La región "enlazadora", y la región de "sustancia hidrófoba" del aptámero con sustancia hidrófoba añadida de la presente descripción pueden estar unidas en el lado del extremo 5' terminal o 3' terminal de la región de "aptámero". También pueden estar unidas ambas en los lados del extremo 5' terminal o 3' terminal de la región de "aptámero". También pueden estar unidas a una base de ácido nucleico o a ribosa o a una región de fosfato en la secuencia de la región de "aptámero".

La región de "aptámero" en el aptámero con sustancia hidrófoba añadida de la presente descripción se puede producir por un método similar al método de producción del aptámero de la presente invención descrito anteriormente. El aptámero con sustancia hidrófoba añadida de la presente descripción se puede sintetizar químicamente por un método conocido por sí mismo en la técnica. Por ejemplo, se puede añadir colesterol al extremo terminal 5' de un aptámero sintetizado, mediante el uso de colesterol TEG fosforamidita disponible comercialmente (fabricado por Glen Research). En este caso, también se puede añadir cualquier enlazador entre el aptámero y el colesterol mediante el uso de forma simultáneo de amidita Spacer18 disponible comercialmente (fabricada por Glen Research) y similares.

Además, utilizando 3'-colesterol TEG-CPG disponible comercialmente (fabricado por Glen Research), el colesterol se puede añadir al extremo 3' terminal de un aptámero. De la misma manera que anteriormente, cualquier enlazador también se puede añadir entre el aptámero y el colesterol mediante el uso de forma simultánea de amidita Spacer18 disponible comercialmente (fabricada por Glen Research) y similares.

Mediante el uso de un método similar, el colesterol también se puede añadir a una base de ácido nucleico o a ribosa o a una región de fosfato en la secuencia.

Por otra parte, cuando se añade un grupo amino al extremo terminal o en un aptámero, el colesterol se puede añadir mediante una reacción de acoplamiento después de la síntesis de ácido nucleico empleando un sintetizador.

Para la adición de un grupo amino en el extremo terminal 5' del aptámero, se puede utilizar 5'-amino-modificador C6-TFA disponible comercialmente (fabricado por Glen Research) y similares.

Para la adición de un grupo amino al extremo 3' terminal del aptámero, se puede utilizar 3'-amino-modificador C7-CPG disponible comercialmente (fabricado por Glen Research) y similares.

El colesterol se puede añadir al aptámero mediante el uso de un grupo amino en una base de ácido nucleico, o mediante la introducción de un grupo amino en la posición 5 de una pirimidina, la posición 6 de una purina y similares. Por otra parte, un grupo amino se puede introducir en la posición 2' de la ribosa o la región de fosfato.

Una reacción de acoplamiento de colesterol y un grupo amino se puede realizar fácilmente mediante la adición de un grupo activo al colesterol. Como resultado, se puede producir el aptámero con sustancia hidrófoba añadida de la presente descripción.

5 La presente descripción también proporciona un complejo que comprende el aptámero de la presente descripción (de aquí en adelante que incluye un aptámero con sustancia hidrófoba añadida) y una sustancia funcional unida al mismo. El enlace entre el aptámero y la sustancia funcional en el complejo de la presente invención puede ser un enlace covalente o un enlace no covalente. El complejo de la presente invención puede ser uno en el que el aptámero de la presente invención y una o varias (por ejemplo, 2 o 3) sustancias funcionales del mismo tipo o de diferentes tipos, están unidos entre sí. La sustancia funcional no está particularmente limitada, en la medida en que confiere de nuevo una cierta función a un aptámero de la presente invención, o es capaz de cambiar (por ejemplo, mejorar) una cierta característica que un aptámero de la presente invención puede poseer. 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 (por ejemplo, biotina, estreptavidina, polinucleótidos que poseen afinidad hacia la secuencia complementaria a la diana, anticuerpos, glutatión Sefarosa, histidina), sustancias para el marcado (por ejemplo, sustancias fluorescentes, sustancias luminiscentes, radioisótopos), enzimas (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina), vehículos para la administración de fármacos (por ejemplo, liposomas, microesferas, péptidos, polietilenglicoles), fármacos (por ejemplo, los que se utilizan en la terapia de misiles, tales como caliqueamicina y duocarmicina; análogos de la mostaza de nitrógeno tales como ciclofosfamida, melfalán, ifosfamida o trofosfamida; etileniminas tales como tiotepa; nitrosoureas tales como carmustina, agentes alquilantes tales como temozolomida o dacarbazina; antagonistas metabólicos similares al 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 la 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, idarubicina 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 (por ejemplo, toxina ricina, liatoxina y toxina Vero). Estas moléculas funcionales se retiran finalmente en algunos casos. Además, las moléculas pueden ser péptidos que pueden ser reconocidos y escindidos por enzimas tales como trombina, metaloproteínasa matricial (MMP) y Factor X, y pueden ser polinucleótidos que pueden ser escindidos por nucleasas o por endonucleasas de restricción.

El aptámero o el complejo de la presente descripción se puede utilizar, por ejemplo, como un medicamento o un agente de diagnóstico, un fármaco para ensayos, un reactivo, un aditivo para el agua potable y los alimentos, un potenciador y un mitigador.

35 El aptámero y el complejo de la presente invención pueden tener una actividad que inhibe la función de FCN mediante la unión a FCN e inhibiendo la unión de FCN y un receptor de FCN. Como se ha mencionado anteriormente, el FCN está muy implicado en el dolor y la inflamación. Por lo tanto, el aptámero (aptámero con sustancia añadida hidrófoba) y el complejo de la presente invención son útiles como medicamentos para la profilaxis o el tratamiento de enfermedades que están acompañadas de dolor o inflamación (agente contra el dolor, agente antiinflamatorio etc.).

40 A continuación, ejemplos de dolor incluyen dolor nociceptivo (dolor muscular, dolor de espalda, dolor en las extremidades superiores, traumatismo por hiperextensión cervical, artralgia, osteoartritis, gota, artritis reumatoide, cefalea, cefalea migrañosa, cefalea catatónica, cefalea en racimos, cefalea secundaria, dolor orofacial, dolor dental, causalgia después de una extracción dental, dolor dental fantasma, dolor de órganos, dolor cardíaco, dolor abdominal, dolor intermenstrual, dismenorrea, dolor de parto, nefralgia, ureteralgia, ostalgia y similares), dolor inflamatorio, dolor neuropático (neuropatía diabética, neuropatía tóxica, dolor después de la operación, dolor de miembro fantasma, dolor de fragmento, distrofia simpática refleja, causalgia, dolor postherpético, neuralgia del trigémino, dolor central), dolor carcinomatoso (dolor debido a la infiltración del cáncer en órganos viscerales, dolor causado por obstrucción de los vasos sanguíneos debido a una infiltración de los vasos sanguíneos con tejido cancerígeno, dolor de metástasis óseas, dolor asociado con metástasis intracerebral, dolor causado por infiltración de los nervios periféricos con tejido cancerígeno), dolor por fibromialgia y similares.

50 Aunque la enfermedad asociada con inflamación en esta memoria no está particularmente limitada, se puede mencionar lupus eritematoso sistémico, esclerosis múltiple, psoriasis, osteoartritis, artritis reumatoide, cistitis intersticial, asma y similares.

Aunque el cáncer mencionado anteriormente no está particularmente limitado, se puede 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, glioblastoma, glioblastoma, cáncer uterino, cáncer cervical, cáncer de ovario, tumor de Wilms, cáncer de próstata y similares.

60 Cuando el FCN se une a su receptor, TrkA, se activa la fosforilación de tirosina de TrkA y Ras-MAPK, PLC- γ , PI3K y similares, aguas abajo de TrkA, y se muestran acciones fisiológicas tales como la supervivencia y la diferenciación de células nerviosas. Por otra parte, induce la muerte celular en la vía de señalización a través del receptor p75. Por

lo tanto, el aptámero y el complejo de la presente descripción se pueden utilizar como medicamentos, agentes de diagnóstico, fármacos de ensayo o reactivos para enfermedades relacionadas con la activación de estas vías de transducción de señales. Ejemplos de enfermedades relacionadas con la activación de estas vías de transducción de señales, incluyen los dolores mencionados anteriormente, enfermedad inflamatoria y cánceres.

5 Cuando el aptámero y el complejo de la presente descripción se utilizan como medicamentos, agentes de diagnóstico, fármacos de ensayo, reactivos y similares, el sujeto al que se va a administrar el aptámero no está particularmente limitado y, por ejemplo, se pueden mencionar los primates (por ejemplo, ser humano, mono), roedores (por ejemplo, ratón, rata, cobaya) y animales de compañía, animales domésticos y animales de trabajo (por ejemplo, perro, gato, caballo, vaca, cabra, oveja, cerdo).

10 El aptámero y el complejo de la presente descripción son capaces de unirse específicamente a FCN. Por lo tanto, el aptámero y el complejo de la presente descripción son útiles como sondas para la detección de FCN. Las sondas son útiles en la formación de imágenes *in vivo* de FCN, las mediciones de concentraciones sanguíneas, la tinción de tejidos, ELISA y similares. Las sondas también son útiles como agentes de diagnóstico, fármacos de ensayo, reactivos y similares para enfermedades que implican FCN (enfermedades acompañadas de dolor o inflamación, y similares).

15 Basándose en su unión específica a FCN, el aptámero y el complejo de la presente descripción se pueden usar como ligandos para la separación y la purificación de FCN.

Además, el aptámero y el complejo de la presente descripción se pueden utilizar como fármacos de ensayos para examinar el estado mental de amor romántico y similares, o medicamentos, reguladores, potenciadores o mitigadores para el control el estado mental.

El aptámero y el complejo de la presente descripción se pueden usar como vehículos para la administración de fármacos.

25 El medicamento de la presente invención puede ser uno formulado con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Como ejemplos de vehículo 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, hidroxilpropil-almidón, sodio-glicol-almidón, carbonato sódico de hidrógeno, fosfato de calcio y citrato de calcio; lubricantes tales como estearato de magnesio, Aerosil, talco y lauril sulfato sódico; agentes aromatizantes tales como ácido cítrico, mentol, sal de glicirricina-amonio, glicina y polvo de color naranja; conservantes tales como benzoato de sodio, sulfito de hidrógeno y 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 bases tales como manteca de cacao, polietilenglicol y queroseno; y similares, pero no son limitativos.

35 Las preparaciones adecuadas para administración oral son una solución preparada mediante la disolución de una cantidad eficaz de ligando en un diluyente tal como agua, solución salina fisiológica o zumo 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 solución de una cantidad eficaz de ingrediente activo en un dispersante adecuado, y similares.

40 El medicamento de la presente invención se puede recubrir por un método conocido en sí mismo, con el fin de enmascarar el sabor, de disolución entérica, de liberación sostenida y similares según sea necesario. Como ejemplos de agentes de recubrimiento utilizados para el recubrimiento se emplean hidroxipropilmetilcelulosa, etilcelulosa, hidroximetilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, polioxietilenglicol, Tween 80, Pluronic F68, acetato ftalato de celulosa, ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa, acetato succinato de hidroximetilcelulosa, Eudragit (fabricado por Rohm, Alemania, copolímero de ácido metacrílico/ácido acrílico), pigmentos (por ejemplo, óxido férrico rojo, dióxido de titanio y similares) y similares. El medicamento puede ser una preparación de liberación rápida o una preparación de liberación sostenida. Ejemplos de bases de liberación sostenida incluyen liposomas, atelocolágeno, gelatina, hidroxipatita, PLGA y similares.

50 Como preparaciones adecuadas para la administración parenteral (por ejemplo, administración intravenosa, administración subcutánea, administración intramuscular, administración tópica, administración intraperitoneal, administración intranasal, administración pulmonar y similares), están disponibles líquidos isotónicos inyectables estériles, acuosos y no acuosos, que pueden comprender un antioxidante, una solución tampón, un agente bacteriostático, un agente isotonzante y similares. Las suspensiones estériles acuosas y no acuosas también se pueden mencionar, los cuales pueden comprender un agente de suspensión, un agente solubilizante, un espesante, un estabilizador, un antiséptico y similares. La preparación se puede incluir 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 se puede disolver o suspender en un vehículo

estéril adecuado antes del uso. Las preparaciones de liberación sostenida también son preparaciones adecuadas. Las preparaciones de liberación sostenida incluyen la liberación sostenida desde vehículos o recipientes incorporados en el cuerpo, tales como huesos artificiales, esponjas biodegradables o no degradables, bolsas, bombas de fármacos, bombas de presión osmótica, y similares. Los dispositivos para la administración continua o intermitente, sistémica o tópica desde fuera del cuerpo también están incluidos en el alcance de preparaciones de liberación sostenida. Las bases biodegradables incluyen liposomas, liposomas catiónicos, poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA), aterocolágeno, gelatina, hidroxapatita, polisacárido sizofirán. Además de las inyecciones de líquidos y la preparación de liberación sostenida, los inhalantes y los ungüentos también son aceptables. En el caso de un inhalante, se microniza un ingrediente activo en un estado liofilizado y se administra mediante inhalación usando un dispositivo de inhalación adecuado. Un inhalante se puede formular si es adecuado con un agente tensioactivo, aceite, saboreante, ciclodextrina o derivado del mismo, y similares usados convencionalmente según sea necesario.

En este caso, como ejemplos de agente tensioactivo, se puede mencionar ácido oleico, lecitina, dioleato de dietilenglicol, oleato de tetrahidroflurulo, 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 (20) y sorbitán (nombre comercial, Tween 20), monooleato de polioxietileno (20) y sorbitán (nombre comercial, Tween 80), lecitina procedente de recursos naturales (nombre comercial, EPICLON), éter oleílico de polioxietileno (2) (nombre comercial, Brij 92), éter estearílico de polioxietileno (2) (nombre comercial, Brij 72), éter laurílico de polioxietileno (4) (nombre comercial, Brij 30), éter oleílico de polioxietileno (2) (nombre comercial, Genapol 0-020), copolímero de bloque de oxietileno y oxipropileno (nombre comercial, Synperonic) y similares. Como ejemplos de aceite, se puede mencionar aceite de maíz, aceite de oliva, aceite de semilla de algodón, aceite de girasol y similares. En el caso de una pomada, una base apropiada farmacéuticamente aceptable (petrolato amarillo, petrolato blanco, parafina, plastibase, silicona, ungüento blanco, cera de abeja, manteca de cerdo, aceites vegetales, pomada hidrófila, vaselina hidrófila, lanolina purificada, lanolina hidrolizada, ungüento hidroabsorbente, plastibase hidrófila, ungüento de macrogol y similares) se mezcla con un ingrediente activo, y se utiliza como una preparación.

Un inhalante se puede producir de acuerdo con un método convencional. Específicamente, un inhalante se puede producir pulverizando o licuando el aptámero descrito anteriormente y el complejo de la presente invención, mezclándolo en un propelente y/o vehículo de inhalación, y rellenando un recipiente de inhalación apropiado. Cuando el aptámero descrito anteriormente y el complejo de la presente invención es un polvo, se puede utilizar un inhalador mecánico ordinario de polvos; en el caso de un líquido, se puede utilizar un inhalador, tal como un nebulizador. En este caso, como propulsor, se puede utilizar extensamente uno conocido convencionalmente; compuestos de la serie de clorofluorocarbonos 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, se pueden mencionar 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 medicamento de la presente invención varía dependiendo del tipo 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 que tiene el sujeto de la administración, del peso corporal, de la edad y similares, y la dosificación usual, basada 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 descripción también proporciona un vehículo en fase sólida que tiene el aptámero y el complejo de la presente descripción inmovilizados sobre el mismo. Como ejemplos del vehículo en fase sólida, se puede mencionar un sustrato, una resina, una placa (por ejemplo, placa de múltiples pocillos), un filtro, un cartucho, una columna y un material poroso. El sustrato puede ser uno de los utilizados 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 silicona, 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 reticulado con poliestireno, partículas de dextrano reticulado con epíclorhidrina, fibra de celulosa, polímeros reticulados de arildextrano y N,N'-metilenbisacrilamida, polímeros sintéticos monodispersos, polímeros hidrófilos monodispersos, Sefarosa, Toyopearl y similares, y también resinas preparadas mediante la unión de varios grupos funcionales a estas resinas. El vehículo en fase sólida de la presente descripción puede ser útil, por ejemplo, en la purificación, la detección y la cuantificación de FCN.

El aptámero y el complejo de la presente descripción se pueden inmovilizar sobre un vehículo en fase sólida mediante un método conocido por sí mismo. Por ejemplo, se puede mencionar un método que introduce una sustancia de afinidad (por ejemplo, las descritas anteriormente) o un grupo funcional predeterminado, en el aptámero (aptámero con sustancia hidrófoba añadida) o el complejo de la presente descripción, y a continuación, se inmoviliza el aptámero y el complejo sobre un vehículo de fase sólida a través de la sustancia de afinidad o el grupo funcional predeter-

minado. La presente descripción también proporciona tales métodos. El grupo funcional predeterminado puede ser un grupo funcional que se puede someter a una reacción de acoplamiento; por ejemplo, se puede mencionar un grupo amino, un grupo tiol, un grupo hidroxilo y un grupo carboxilo. La presente invención también proporciona un aptámero que tiene un grupo funcional de este tipo introducido en el mismo.

5 La presente descripción también proporciona un método para purificar y concentrar FCN. En particular, la presente descripción hace posible la separación de FCN de las proteínas de otras proteínas de la familia. El método de purificación y concentración de la presente descripción puede comprender la adsorción de FCN al vehículo en fase sólida de la presente descripción, y eluir el FCN adsorbido con un eluyente. La adsorción de FCN al vehículo en fase sólida de la presente descripción se puede conseguir por un método conocido por sí mismo. Por ejemplo, una muestra que
10 contiene FCN (por ejemplo, un cultivo bacteriano o celular o material sobrenadante de un cultivo, sangre) se introduce en el vehículo en fase sólida de la presente descripción o una composición que contiene el mismo. El FCN se puede eluir usando un eluyente tal como una solución neutra. No hay limitación en el eluyente neutro, que puede tener un pH, por ejemplo, de aproximadamente 6 a aproximadamente 9, preferiblemente de aproximadamente 6,5 a
15 aproximadamente 8,5 y más preferiblemente de aproximadamente 7 a aproximadamente 8. La solución neutra también puede comprender, por ejemplo, urea, un agente quelante (por ejemplo, EDTA), una sal de potasio (por ejemplo, KCl), una sal de magnesio (por ejemplo, MgCl₂), un agente tensioactivo (por ejemplo, Tween 20, Triton, NP40) y glicerina. El método de purificación y concentración de la presente descripción puede comprender, además, el lavado del vehículo en fase sólida usando una solución de lavado después de la adsorción de FCN. Ejemplos de la solución de lavado incluyen los que contienen urea, un agente quelante (por ejemplo, EDTA), Tris, un ácido, un álcali,
20 ARN de transferencia, ADN, agentes tensioactivos tales como Tween 20, sales tales como NaCl y similares. El método de purificación y concentración de la presente descripción todavía puede comprender adicionalmente calentar el vehículo en fase sólida. Este paso permite la regeneración y la esterilización del vehículo en fase sólida.

La presente descripción también proporciona un método de detección y cuantificación de FCN. En particular, la presente descripción hace posible detectar y cuantificar FCN separadamente de las proteínas de otras proteínas de la familia. El método de detección y cuantificación de la presente descripción puede comprender la medición de FCN
25 mediante la utilización del aptámero de la presente descripción (por ejemplo, mediante el uso del complejo y del vehículo en fase sólida de la presente descripción). El método de detección y cuantificación de FCN se puede realizar de la misma manera que un método inmunológico, con la excepción de que el aptámero de la presente descripción se utiliza en lugar de un anticuerpo. Por lo tanto, mediante el uso del aptámero de la presente descripción como una sonda en lugar de un anticuerpo, de la misma manera que métodos tales como el inmunoensayo enzimático (EIA) (por ejemplo, ELISA directo competitivo, ELISA indirecto competitivo, ELISA de tipo sándwich), radioinmunoensayo (RIA), inmunoensayo fluorescente (FIA), técnica de transferencia Western, método de tinción inmunohistoquímica y método de clasificación de células, se puede realizar la detección y la cuantificación. El aptámero de la presente descripción también se puede utilizar como una sonda molecular para PET y similares. Estos métodos
30 pueden ser útiles, por ejemplo, para medir el contenido de FCN en organismos vivos o muestras biológicas, y para diagnosticar una enfermedad asociada con FCN.

Ejemplos

La presente invención se describe a continuación con más detalle por medio de los siguientes Ejemplos.

Ejemplo 1: Aptámero de ARN

40 (1) Producción del aptámero de ARN

La secuencia del aptámero de ARN se determinó basándose en el aptámero mostrado por SEQ ID NOs: 40, 60, 62, 67 y 68, descritas en el documento PCT/JP09/066457. Estos aptámeros de ARN se habían producido por un método que utiliza una transcriptasa o síntesis química mediante un método de fosforamidita. Puesto que la síntesis química de ARN de cadena larga es difícil, se utilizó una transcriptasa para la producción. Para ser más específicos, los
45 aptámeros que se muestran por las IDs de aptámero: 1 - 25 y las IDs de aptámero: 27 - 54 fueron obtenidos mediante transcripción y los aptámeros mostrados por las IDs de aptámero: 26, 26(1) - (72), 29(1) y las IDs de aptámero: 55 - 63 se obtuvieron mediante síntesis química.

La transcripción se llevó a cabo mediante la producción de ADN del aptámero objeto por síntesis química, y el uso del kit de transcripción con T7 de DuraScribe (marca registrada) (fabricado por Epicentre). El ARN obtenido por este
50 método tiene una posición 2' fluorada de la ribosa del nucleótido de pirimidina. El producto de la transcripción se trató con ADNasa, la proteína se eliminó mediante un tratamiento con fenol-cloroformo y el ARN se recogió por precipitación con etanol. La pureza del aptámero recuperado se confirmó por electroforesis en poliacrilamida, y la cantidad se confirmó por un método de medición de la absorbancia.

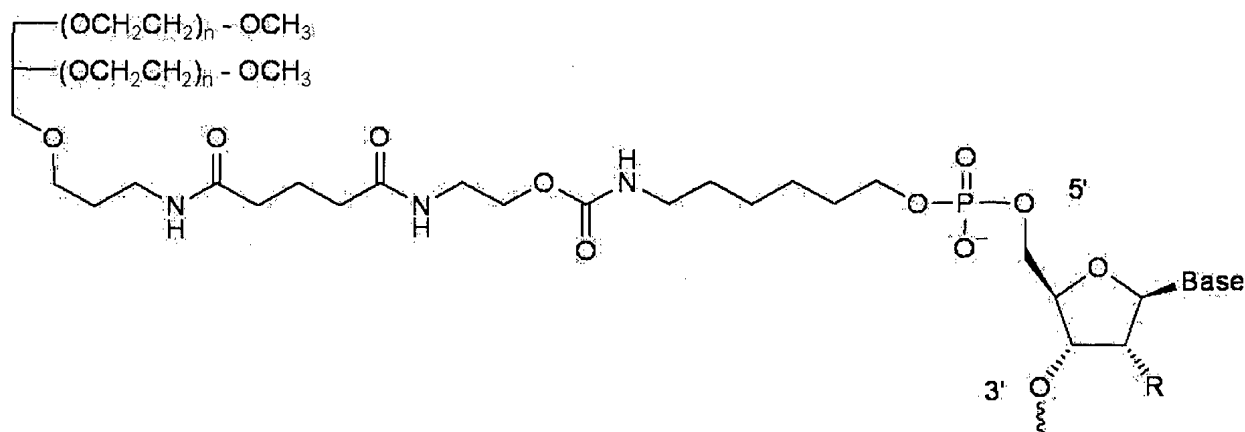
La síntesis química se realizó mediante un método de fosforamidita. La síntesis química por un método de fosforamidita es un método empleado generalmente, que es como se describe en Nucleic Acid (vol. 2) [1] Synthesis and Analysis of Nucleic Acid (Editor: Yukio Sugiura, Hirokawa Publishing Company) y similares. De hecho, el sintetizador de ácido nucleico (ABI394), fabricado por Applied Biosystems y similares, se utilizaron para la síntesis, y el producto sintetizado se purificó por el método de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC). La pureza de la sustancia
55

sintética final fue determinada por HPLC, y se aprobó un mínimo del 85%. El peso molecular se confirmó mediante MALDI-TOFMS que era idéntico al peso molecular teórico.

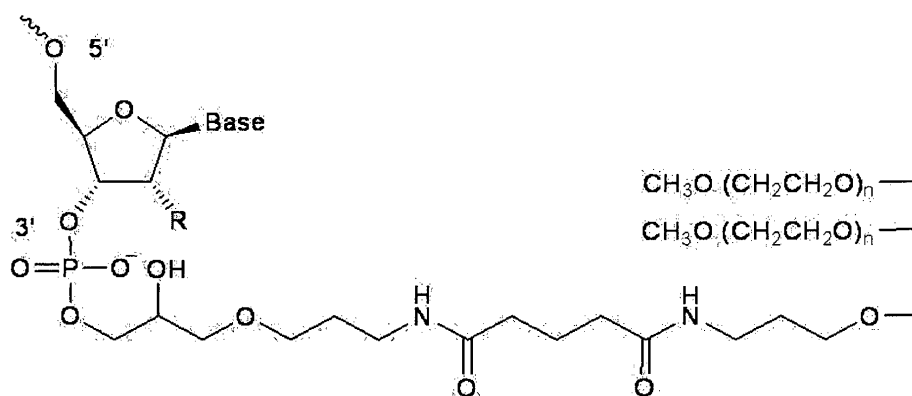
Un aptámero al que se añade una cadena de polietilenglicol (PEG) en el extremo 5' terminal o 3' terminal, se sintetizó del modo siguiente. En primer lugar, un aptámero al que se había añadido con un enlazador que tenía un grupo amino en el extremo 5' terminal o 3' terminal, se sintetizó utilizando un sintetizador de ácido nucleico. Para el extremo 5' terminal, se empleó un enlazador ssH (SAFC) o DMS (O) MT-AMINO-MODIFIER C6 (GLENRESEARCH) y para el extremo 3' terminal, se utilizó TFA Amino C-6 Icaa CPG (ChemGenes). Los aptámeros con estos grupos amino añadidos se purificaron mediante HPLC, y la pureza se analizó por HPLC y MALDI-TOFMS. A continuación, estos aptámeros se mezclaron con PEG de tipo GS con 2 ramificaciones que tenía un peso molecular de 40.000 (SUNBRIGHT GL2-400GS2 fabricado por NOF CORPORATION), PEG de tipo TS con 2 ramificaciones que tenía un peso molecular de 40.000 (SUNBRIGHT GL2-400TS fabricado por NOF CORPORATION), PEG de tipo TS con 2 ramificaciones que tenía un peso molecular de 40.000 (SUNBRIGHT GL4-400TS fabricado por NOF CORPORATION), PEG de tipo TS con 2 ramificaciones que tenía un peso molecular de 80.000 (SUNBRIGHT GL2-800TS fabricado por NOF CORPORATION) o PEG de tipo TS con 4 ramificaciones que tenía un peso molecular de 80.000 (SUNBRIGHT GL4-800TS fabricado por NOF Corporation), cada uno de los cuales tenía añadido el grupo activo N-hidroxisuccinimida, y se dejaron reaccionar a temperatura ambiente para unir el PEG y el aptámero mediante un enlace amida. Después de completar la reacción, la purificación y el análisis de la pureza se llevaron a cabo por HPLC.

Ejemplos de la estructura parcial del aptámero obtenido de este modo de la presente invención, en el que el extremo terminal está modificado con PEG, se muestran a continuación.

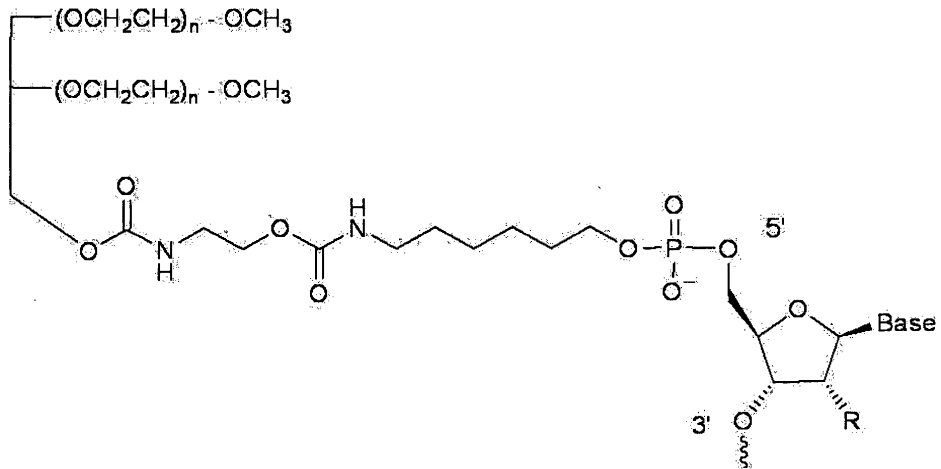
(1) una estructura en la que el aptámero se une a PEG de tipo GS con 2 ramificaciones a través de un enlazador ssH (Ta):



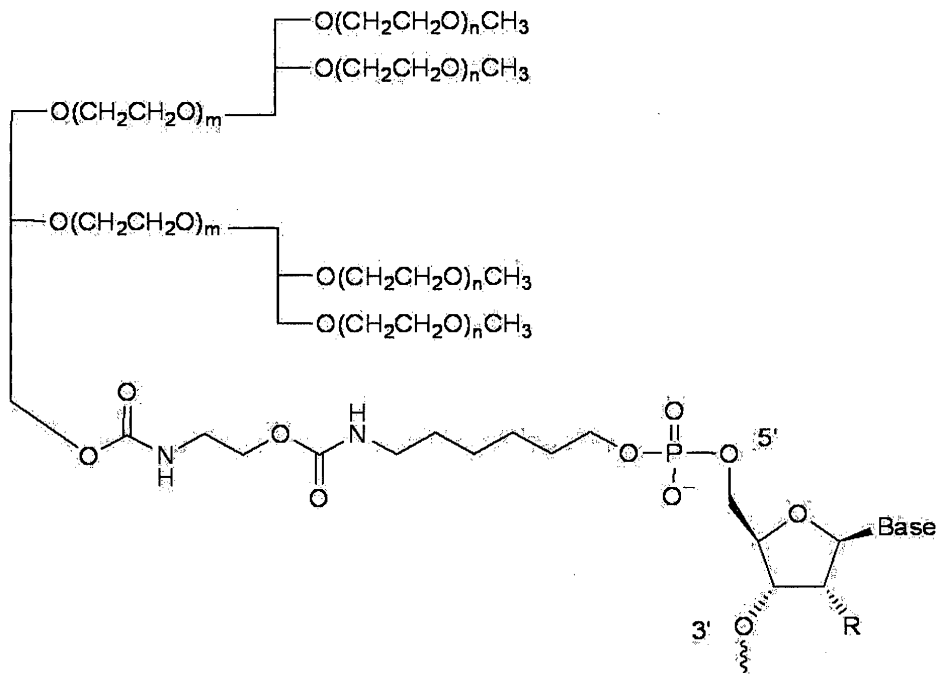
(2) una estructura en la que el aptámero se une a PEG de tipo GS con 2 ramificaciones a través de TFA Amino C-6 (Tc):



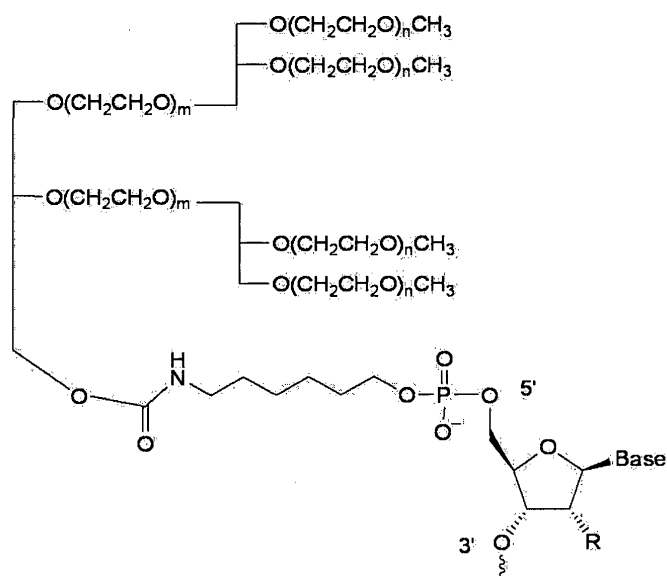
(3) una estructura en la que el aptámero se une a PEG de tipo TS con 2 ramificaciones a través del enlazador ssH (Ta):



5 (4) una estructura en la que el aptámero se une a PEG de tipo TS con 4 ramificaciones a través del enlazador ssH (Ta):



(5) una estructura en la que el aptámero se une a PEG de tipo TS con 4 ramificaciones a través de DMS (O) MT-AMINO-MODIFIER C6 (Tb):



5 Los nucleótidos de los aptámeros realmente obtenidos representados por las IDs de aptámero: 1 - 54 se muestran en la siguiente Tabla 1 siguiente.

A menos que se indique en particular, la unión entre los nucleótidos es un enlace fosfodiéster. Las letras minúsculas indican el ARN, las letras mayúsculas indican el ADN, y s indica un enlace fosforotioato. Los paréntesis en el nucleótido indican una modificación en la posición 2' de la ribosa, F indica un átomo de flúor, M indica un grupo O-metilo y L indica un ácido nucleico bloqueado (LNA). Por ejemplo, g (M) indicado a continuación, significa g en donde la posición 2' está modificada con un grupo O-metilo. Ta indica la región enlazadora cuando se utiliza el enlazador ssH para unir PEG y el aptámero, Tb indica la región enlazadora cuando DMS (O) MT-AMINO-MODIFIER C6 se utiliza para unir PEG y el aptámero, y Tc indica la región enlazadora cuando TFA Amino C-6 se utiliza para unir PEG y el aptámero. idT indica dT invertida. PEG40GS2 es de tipo GS con 2 ramificaciones que tiene un peso molecular de 40.000 (SUNBRIGHT GL2-400GS2 fabricado por NOF CORPORATION), PEG40TS2 es de tipo TS con 2 ramificaciones que tiene un peso molecular de 40.000 (SUNBRIGHT GL2-400TS fabricado por NOF CORPORATION), PEG40TS4 es de tipo TS con 4 ramificaciones que tiene un peso molecular de 40.000 (SUNBRIGHT GL4-400TS fabricado por NOF CORPORATION), PEG80TS2 es de tipo TS con 2 ramificaciones que tiene un peso molecular de 80.000 (SUNBRIGHT GL2-800TS fabricado por NOF CORPORATION), y PEG80TS4 es de tipo TS con 4 ramificaciones que tiene un peso molecular de 80.000 (SUNBRIGHT GL4-800TS fabricado por NOF CORPORATION).

20 Los aptámeros mostrados con las IDs de aptámero: 1 - 30 contienen una secuencia de consenso UGAAAGAAACC (SEQ ID NO: 67). Los aptámeros mostrados con las IDs de aptámero: 31 - 51 contienen una secuencia de consenso CGAACAAAACU (SEQ ID NO: 68). Los aptámeros mostrados con las IDs de aptámero: 52, 53, 54 contienen cada uno secuencias de consenso UGAAAAAAACC (SEQ ID NO: 66), CGAAAGAAACU (SEQ ID NO: 69).

[Tabla 1-1]

ID de aptámero	aptámero preparado	SEQ ID NO:
1	gggagaac (F) u (F) u (F) c (F) gac (F) c (F) agaag u (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) a	1
2	gggagaac (F) u (F) u (F) c (F) gac (F) c (F) agaag u (F) u (F) u (F) gaaagaaac (F) c (F) c (F) aaau (F) u (F) aaagu (F) gaagu (F) au (F) gu (F) gc (F) gc (F) au (F) ac (F) au (F) u (F) c (F) c (F) u (F) c (F) a	2

ES 2 567 270 T3

ID de aptámero	aptámero preparado	SEQ ID NO:
3	gggagaac (F) u (F) u (F) c (F) gac (F) c (F) agaag u (F) u (F) u (F) gaaagaaac (F) c (F) c (F) aaau (F) u (F) aaaggaac (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	3
4	gggagaac (F) u (F) u (F) c (F) gac (F) c (F) agaag u (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) u (F) ggau (F) c (F) c (F) u (F) c (F) a	4
5	gggagaac (F) u (F) u (F) c (F) gac (F) c (F) agaag u (F) u (F) u (F) gaaagaaac (F) c (F) c (F) aaau (F) u (F) aaaaac (F) agu (F) au (F) gu (F) gc (F) g c (F) au (F) ac (F) a	5
6	gggagaac (F) u (F) u (F) c (F) gac (F) c (F) agaag u (F) u (F) u (F) gaaagaaac (F) c (F) c (F) aaaaaa gu (F) gaac (F) agu (F) au (F) gu (F) gc (F) gc (F) au (F) ac (F) a	6
7	gggagaac (F) u (F) u (F) c (F) gac (F) c (F) agaag u (F) u (F) u (F) gaaagaaac (F) c (F) c (F) aaau (F) u (F) aaaggaagu (F) au (F) gu (F) gc (F) gc (F) au (F) ac (F) a	7
8	gggagaac (F) u (F) u (F) c (F) gac (F) c (F) agaag u (F) u (F) u (F) gaaagaaac (F) c (F) c (F) aaau (F) u (F) aaagu (F) gaac (F) agau (F) gu (F) gc (F) gc (F) au (F) c (F) a	8
9	gggagaac (F) u (F) u (F) c (F) gac (F) c (F) agaag u (F) u (F) u (F) gaaagaaac (F) c (F) c (F) aaau (F) u (F) aaaaagau (F) gu (F) gc (F) gc (F) au (F) c (F) a	9

[Tabla 1-2]

ID de aptámero	aptámero preparado	SEQ ID NO:
10	gggagaac (F) u (F) u (F) c (F) gc (F) c (F) agaag u (F) u (F) u (F) gaaagaaac (F) c (F) c (F) aaau (F) u (F) aaaaagu (F) au (F) gu (F) gc (F) gc (F) au (F) ac (F) a	10
11	gggagaac (F) u (F) u (F) c (F) gc (F) c (F) agaag u (F) u (F) u (F) gaaagaaac (F) c (F) c (F) aaau (F) aaaaagu (F) au (F) gu (F) gc (F) gc (F) au (F) ac (F) a	11

ES 2 567 270 T3

ID de aptámero	aptámero preparado	SEQ ID NO:
12	gggagaac (F) u (F) u (F) c (F) gc (F) c (F) agaag u (F) u (F) u (F) gaaagaaac (F) c (F) c (F) aaau (F) u (F) aaaagu (F) au (F) gu (F) gc (F) gc (F) a u (F) ac (F) a	12
13	gggagaac (F) u (F) u (F) c (F) gc (F) c (F) agaag u (F) u (F) u (F) gaaagaaac (F) c (F) c (F) aaau (F) u (F) aaagu (F) au (F) gu (F) gc (F) gc (F) au (F) ac (F) a	13
14	gggagaac (F) u (F) u (F) c (F) gc (F) c (F) agaag u (F) u (F) u (F) gaaagaaac (F) c (F) c (F) aaau (F) u (F) aaaaagu (F) au (F) gu (F) gc (F) gc (F) au (F) ac (F) a	14
15	gggagaac (F) u (F) u (F) c (F) gc (F) c (F) agaag u (F) u (F) u (F) gaaagaaac (F) c (F) c (F) au (F) u (F) aaaaagu (F) au (F) gu (F) gc (F) gc (F) au (F) ac (F) a	15
16	gggagaac (F) u (F) u (F) c (F) gc (F) c (F) agaag u (F) u (F) u (F) gaaagaaac (F) c (F) c (F) aaau (F) u (F) aaaaagau (F) gu (F) gc (F) gc (F) au (F) c (F) a	16
17	gggagaac (F) u (F) u (F) c (F) gc (F) c (F) agaag u (F) u (F) u (F) gaaagaaac (F) c (F) c (F) aaau (F) u (F) aaagau (F) gu (F) gc (F) gc (F) au (F) c (F) a	17
18	gggagaac (F) u (F) u (F) c (F) gc (F) c (F) agaag u (F) u (F) u (F) gaaagaaac (F) c (F) c (F) aaau (F) aaagau (F) gu (F) gc (F) gc (F) au (F) c (F) a	18
19	gggagaac (F) u (F) u (F) c (F) gc (F) c (F) agaag u (F) u (F) u (F) gaaagaaac (F) c (F) c (F) aaau (F) aaagau (F) gu (F) gc (F) gc (F) au (F) c (F)	19
20	gggagaac (F) u (F) u (F) c (F) gc (F) c (F) agaag u (F) u (F) u (F) gaaagaaac (F) c (F) c (F) aaau (F) aaagu (F) gu (F) gc (F) gc (F) ac (F) a	20

[Tabla 1-3]

ID de aptámero	aptámero preparado	SEQ ID NO:
21	gggagaac (F) u (F) u (F) c (F) gc (F) c (F) agaag u (F) u (F) u (F) gaaagaaac (F) c (F) c (F) aaau (F) aaagagu (F) gc (F) gc (F) u (F) c (F) a	21

ES 2 567 270 T3

ID de aptámero	aptámero preparado	SEQ ID NO:
22	gggagac (F) u (F) c (F) gc (F) c (F) agagu (F) u (F) gaaagaaac (F) c (F) c (F) aaau (F) aaagau (F) gu (F) gc (F) gc (F) au (F) c (F) a	22
23	gggagaac (F) u (F) u (F) c (F) gc (F) c (F) agaag u (F) u (F) u (F) gaaagaaac (F) c (F) c (F) aaau (F) aagu (F) gu (F) gc (F) gc (F) ac (F) a	23
24	gggagaac (F) u (F) u (F) c (F) gc (F) c (F) agaag u (F) u (F) u (F) gaaagaaac (F) c (F) c (F) aaau (F) aagu (F) gu (F) gc (F) gc (F) ac (F)	24
25	gggagac (F) u (F) c (F) gc (F) c (F) agagu (F) u (F) gaaagaaac (F) c (F) c (F) aaau (F) aaagu (F) gu (F) gc (F) gc (F) ac (F) a	25
26	gggagac (F) u (F) c (F) gc (F) c (F) agagu (F) u (F) gaaagaaac (F) c (F) c (F) aaau (F) aagu (F) gu (F) gc (F) gc (F) ac (F)	26
26 (1)	idT-g (M) g (M) ga (M) ga (M) c (F) u (F) c (F) g (M) c (F) c (F) a (M) g (M) a (M) g (M) u (F) u (F) ga aaga (M) aa (M) c (F) c (F) c (F) a (M) a (M) a (M) u (F) a (M) a (M) g (M) u (F) g (M) u (F) g (M) c (F) g (M) c (F) a (M) c (F) -idT	26
26 (2)	idT-g (M) g (M) ga (M) ga (M) c (F) u (F) c (F) g (M) c (F) c (F) a (M) g (M) a (M) g (M) u (F) u (F) ga aag (M) aa (M) ac (F) c (F) c (F) a (M) a (M) a (M) u (F) a (M) a (M) g (M) u (F) g (M) u (F) g (M) c (F) g (M) c (F) a (M) c (F) -idT	26
26 (3)	gggaga (M) c (F) u (F) c (F) g (M) c (F) c (F) a (M) g (M) a (M) g (M) u (F) u (F) gaaagaaac (F) c (F) c (F) aaau (F) aagu (F) gu (F) gc (F) gc (F) ac (F)	26
26 (4)	g (M) g (M) ga (M) g (M) ac (F) u (F) c (F) gc (F) c (F) agagu (F) u (F) gaaag (M) a (M) a (M) a (M) c (F) c (F) c (F) aaau (F) aagu (F) gu (F) gc (F) gc (F) ac (F)	26
26 (5)	gggagac (F) u (F) c (F) gc (F) c (F) agagu (F) u (F) gaaagaaac (F) c (F) c (F) a (M) a (M) a (M) u (F) a (M) a (M) gu (F) gu (F) gc (F) gc (F) ac (F)	26

ES 2 567 270 T3

[Tabla 1-4]

ID de aptámero	aptámero preparado	SEQ ID NO:
26 (6)	gggagac (F) u (F) c (F) gc (F) c (F) agagu (F) u (F) gaaagaaac (F) c (F) c (F) aaau (F) aag (M) u (F) g (M) u (F) g (M) c (F) g (M) c (F) a (M) c (F)	26
26 (7)	gggagac (F) u (F) c (F) gc (F) c (F) agagu (F) u (F) gaa (M) agaaac (F) c (F) c (F) aaau (F) aagu (F) gu (F) gc (F) gc (F) ac (F)	26
26 (8)	gggagac (F) u (F) c (F) gc (F) c (F) agagu (F) u (F) gaaa (M) gaaac (F) c (F) c (F) aaau (F) aagu (F) gu (F) gc (F) gc (F) ac (F)	26
26 (9)	idT-g (M) g (M) ga (M) ga (M) c (F) u (F) c (F) g (M) c (F) c (F) a (M) g (M) a (M) g (M) u (F) u (F) ga aag (M) a (M) a (M) ac (F) c (F) c (F) a (M) a (M) a (M) u (F) a (M) a (M) g (M) u (F) g (M) u (F) g (M) c (F) g (M) c (F) a (M) c (F) -idT	26
26 (10)	idT-g (M) g (M) ga (M) ga (M) c (F) u (F) c (F) g (M) c (F) c (F) a (M) g (M) a (M) g (M) u (F) u (F) ga aag (M) aa (M) a (M) c (F) c (F) c (F) a (M) a (M) a (M) u (F) a (M) a (M) g (M) u (F) g (M) u (F) g (M) c (F) g (M) c (F) a (M) c (F) -idT	26
26 (11)	idT-g (M) g (M) ga (M) ga (M) c (F) u (F) c (F) g (M) c (F) c (F) a (M) g (M) a (M) g (M) u (F) u (F) ga aag (M) a (M) a (M) a (M) c (F) c (F) c (F) a (M) a (M) a (M) a (M) u (F) a (M) a (M) g (M) u (F) g (M) u (F) g (M) c (F) g (M) c (F) a (M) c (F) -idT	26
26 (12)	idT-g (M) g (M) ga (M) g (M) a (M) c (F) u (F) c (F) g (M) c (F) c (F) a (M) g (M) a (M) g (M) u (F) u (F) g aaag (M) aa (M) ac (F) c (F) c (F) a (M) a (M) a (M) u (F) a (M) a (M) g (M) u (F) g (M) u (F) g (M) c (F) g (M) c (F) a (M) c (F) -idT	26
26 (13)	idT-g (M) g (M) ga (M) ga (M) c (F) u (F) c (F) g (M) c (F) c (F) a (M) g (M) a (M) g (M) u (F) u (F) ga a (M) ag (M) aa (M) ac (F) c (F) c (F) a (M) a (M) a (M) u (F) a (M) a (M) g (M) u (F) g (M) u (F) g (M) c (F) g (M) c (F) a (M) c (F) -idT	26
26 (14)	idT-g (M) g (M) ga (M) ga (M) c (F) u (F) c (F) g (M) c (F) c (F) a (M) g (M) a (M) g (M) u (F) u (F) ga aa (M) g (M) aa (M) ac (F) c (F) c (F) a (M) a (M) a (M) u (F) a (M) a (M) g (M) u (F) g (M) u (F) g (M) c (F) g (M) c (F) a (M) c (F) -idT	26

[Tabla 1-5]

ID de aptámero	aptámero preparado	SEQ ID NO:
26 (15)	idT-g (M) g (M) ga (M) ga (M) c (F) u (F) c (F) g (M) c (F) c (F) a (M) g (M) a (M) g (M) u (F) u (F) ga a (M) a (M) g (M) aa (M) ac (F) c (F) c (F) a (M) a (M) a (M) u (F) a (M) a (M) g (M) u (F) g (M) u (F) g (M) c (F) g (M) c (F) a (M) c (F) -idT	26
26 (16)	PEG40GS2-Ta-g (M) g (M) ga (M) ga (M) c (F) u (F) c (F) g (M) c (F) c (F) a (M) g (M) a (M) g (M) u (F) u (F) gaaag (M) aa (M) ac (F) c (F) c (F) a (M) a (M) a (M) u (F) a (M) a (M) g (M) u (F) g (M) u (F) g (M) c (F) g (M) c (F) a (M) c (F) -idT	26
26 (17)	idT-g (M) g (M) ga (M) ga (M) c (F) u (F) c (F) g (M) c (F) c (F) a (M) g (M) a (M) g (M) u (F) u (F) ga aag (M) aa (M) ac (F) c (F) c (F) a (M) a (M) a (M) u (F) a (M) a (M) g (M) u (F) g (M) u (F) g (M) c (F) g (M) c (F) a (M) c (F) -Tc-PEG40GS2	26
26 (18)	idT-g (M) g (M) ga (M) g (M) a (M) c (F) u (F) c (F) g (M) c (F) c (F) a (M) g (M) a (M) g (M) u (F) u (F) g aa (M) a (M) g (M) a (M) a (M) a (M) c (F) c (F) c (F) a (M) a (M) a (M) u (F) a (M) a (M) g (M) u (F) g (M) u (F) g (M) c (F) g (M) c (F) a (M) c (F) -idT	26
26 (19)	idT-g (M) g (M) ga (M) g (M) a (M) c (F) u (F) c (F) g (M) c (F) c (F) a (M) g (M) a (M) g (M) u (F) u (F) g aa (M) a (M) g (M) a (M) a (M) ac (F) c (F) c (F) a (M) a (M) a (M) u (F) a (M) a (M) g (M) u (F) g (M) u (F) g (M) c (F) g (M) c (F) a (M) c (F) -idT	26
26 (20)	idT-g (M) g (M) ga (M) g (M) a (M) c (F) u (F) c (F) g (M) c (F) c (F) a (M) g (M) a (M) g (M) u (F) u (F) g aa (M) a (M) g (M) aa (M) a (M) c (F) c (F) c (F) a (M) a (M) a (M) u (F) a (M) a (M) g (M) u (F) g (M) u (F) g (M) c (F) g (M) c (F) a (M) c (F) -idT	26
26 (21)	idT-g (M) g (M) ga (M) g (M) a (M) Cu (F) c (F) g (M) c (F) c (F) a (M) g (M) a (M) g (M) u (F) u (F) ga a (M) a (M) g (M) a (M) a (M) ac (F) c (F) c (F) a (M) a (M) a (M) u (F) a (M) a (M) g (M) u (F) g (M) u (F) g (M) c (F) g (M) c (F) a (M) c (F) -idT	26

[Tabla 1-6]

ID de aptámero	aptámero preparado	SEQ ID NO:
26 (22)	idT-g (M) g (M) ga (M) g (M) a (M) c (F) Tc (F) g (M) c (F) c (F) a (M) g (M) a (M) g (M) u (F) u (F) ga a (M) a (M) g (M) a (M) a (M) ac (F) c (F) c (F) a (M) a (M) a (M) u (F) a (M) a (M) g (M) u (F) g (M) u (F) g (M) c (F) g (M) c (F) a (M) c (F) -idT	26
26 (23)	idT-g (M) g (M) ga (M) g (M) a (M) c (F) u (F) Cg (M) c (F) c (F) a (M) g (M) a (M) g (M) u (F) u (F) ga a (M) a (M) g (M) a (M) a (M) ac (F) c (F) c (F) a (M) a (M) a (M) u (F) a (M) a (M) g (M) u (F) g (M) u (F) g (M) c (F) g (M) c (F) a (M) c (F) -idT	26
26 (24)	idT-g (M) g (M) ga (M) g (M) a (M) c (F) u (F) c (F) g (M) Cc (F) a (M) g (M) a (M) g (M) u (F) u (F) gaa (M) a (M) g (M) a (M) a (M) ac (F) c (F) c (F) a (M) a (M) a (M) u (F) a (M) a (M) g (M) u (F) g (M) u (F) g (M) c (F) q (M) c (F) a (M) c (F) -idT	26
26 (25)	idT-g (M) g (M) ga (M) g (M) a (M) c (F) u (F) c (F) g (M) c (F) Ca (M) g (M) a (M) g (M) u (F) u (F) gaa (M) a (M) g (M) a (M) a (M) ac (F) c (F) c (F) a (M) a (M) a (M) u (F) a (M) a (M) g (M) u (F) g (M) u (F) g (M) c (F) g (M) c (F) a (M) c (F) -idT	26
26 (26)	idT-g (M) g (M) ga (M) g (M) a (M) c (F) u (F) c (F) g (M) c (F) c (F) a (M) g (M) a (M) g (M) Tu (F) gaa (M) a (M) g (M) a (M) a (M) ac (F) c (F) c (F) a (M) a (M) a (M) u (F) a (M) a (M) g (M) u (F) g (M) u (F) g (M) c (F) g (M) c (F) a (M) c (F) -idT	26
26 (27)	idT-g (M) g (M) ga (M) g (M) a (M) c (F) u (F) c (F) g (M) c (F) c (F) a (M) g (M) a (M) g (M) u (F) u (F) g aa (M) a (M) g (M) a (M) a (M) ac (F) c (F) Ca (M) a (M) a (M) u (F) a (M) a (M) g (M) u (F) g (M) u (F) g (M) c (F) g (M) c (F) a (M) c (F) -idT	26
26 (28)	idT-g (M) g (M) ga (M) g (M) a (M) c (F) u (F) c (F) g (M) c (F) c (F) a (M) g (M) a (M) g (M) u (F) u (F) g aa (M) a (M) g (M) a (M) a (M) ac (F) c (F) c (F) a (M) a (M) a (M) Ta (M) a (M) g (M) u (F) g (M) u (F) g (M) c (F) g (M) c (F) a (M) c (F) -idT	26
26 (29)	idT-g (M) g (M) ga (M) g (M) a (M) c (F) u (F) c (F) g (M) c (F) c (F) a (M) g (M) a (M) g (M) u (F) u (F) g aa (M) a (M) g (M) a (M) a (M) ac (F) c (F) c (F) a (M) a (M) a (M) u (F) a (M) a (M) g (M) Tg (M) u (F) g (M) c (F) g (M) c (F) a (M) c (F) -idT	26

[Tabla 1-7]

ID de aptámero	aptámero preparado	SEQ ID NO:
26 (30)	idT-g (M) g (M) ga (M) g (M) a (M) c (F) u (F) c (F) g (M) c (F) c (F) a (M) g (M) a (M) g (M) u (F) u (F) g aa (M) a (M) g (M) a (M) a (M) ac (F) c (F) c (F) a (M) a (M) a (M) u (F) a (M) a (M) g (M) u (F) g (M) u (F) g (M) c (F) g (M) c (F) a (M) C-idT	26
26 (31)	idT-g (M) g (M) ga (M) g (M) a (M) c (M) u (F) c (F) g (M) c (F) c (F) a (M) g (M) a (M) g (M) u (F) u (F) g aa (M) a (M) g (M) a (M) a (M) ac (F) c (F) c (F) a (M) a (M) a (M) u (F) a (M) a (M) g (M) u (F) g (M) u (F) g (M) c (F) g (M) c (F) a (M) c (F) -idT	26
26 (32)	idT-g (M) g (M) ga (M) g (M) a (M) c (F) u (F) c (F) g (M) c (M) c (F) a (M) g (M) a (M) g (M) u (F) u (F) g aa (M) a (M) g (M) a (M) a (M) ac (F) c (F) c (F) a (M) a (M) a (M) u (F) a (M) a (M) g (M) u (F) g (M) u (F) g (M) c (F) g (M) c (F) a (M) c (F) -idT	26
26 (33)	idT-g (M) g (M) ga (M) g (M) a (M) c (F) u (F) c (F) g (M) c (F) c (M) a (M) g (M) a (M) g (M) u (F) u (F) g aa (M) a (M) g (M) a (M) a (M) ac (F) c (F) c (F) a (M) a (M) a (M) u (F) a (M) a (M) g (M) u (F) g (M) u (F) g (M) c (F) g (M) c (F) a (M) c (F) -idT	26
26 (34)	idT-g (M) g (M) ga (M) g (M) a (M) c (F) u (F) c (F) g (M) c (F) c (F) a (M) g (M) a (M) g (M) u (F) u (F) g aa (M) a (M) g (M) a (M) a (M) ac (F) c (F) c (F) a (M) a (M) a (M) u (M) a (M) a (M) g (M) u (F) g (M) u (F) g (M) c (F) g (M) c (F) a (M) c (F) -idT	26
26 (35)	idT-g (M) g (M) ga (M) g (M) a (M) c (F) u (F) c (F) g (M) c (F) c (F) a (M) g (M) a (M) g (M) u (F) u (F) g aa (M) a (M) g (M) a (M) a (M) ac (F) c (F) c (F) a (M) a (M) a (M) u (F) a (M) a (M) g (M) u (F) g (M) u (F) g (M) c (F) g (M) c (F) a (M) c (M) -idT	26
26 (36)	idT-g (M) g (M) gsa (M) g (M) a (M) c (M) u (F) c (F) g (M) c (F) c (F) a (M) g (M) a (M) g (M) u (F) u (F) (F) gaa (M) a (M) g (M) a (M) a (M) ac (F) c (F) c (F) a (M) a (M) a (M) u (F) a (M) a (M) g (M) u (F) g (M) u (F) g (M) c (F) g (M) c (F) a (M) c (F) -idT	26
26 (37)	idT-g (M) g (M) ga (M) g (M) a (M) c (M) u (F) c (F) g (M) c (F) c (F) a (M) g (M) a (M) g (M) u (F) u (F) s gaa (M) a (M) g (M) a (M) a (M) ac (F) c (F) c (F) a (M) a (M) a (M) u (F) a (M) a (M) g (M) u (F) g (M) u (F) g (M) c (F) g (M) c (F) a (M) c (F) -idT	26

[Tabla 1-8]

ID de aptámero	aptámero preparado	SEQ ID NO:
26 (38)	idT-g (M) g (M) ga (M) g (M) a (M) c (M) u (F) c (F) g (M) c (F) c (F) a (M) g (M) a (M) g (M) u (F) u (F) g asa (M) a (M) g (M) a (M) a (M) ac (F) c (F) c (F) a (M) a (M) a (M) u (F) a (M) a (M) g (M) u (F) g (M) u (F) g (M) c (F) g (M) c (F) a (M) c (F) -idT	26
26 (39)	idT-g (M) g (M) ga (M) g (M) a (M) c (M) u (F) c (F) g (M) c (F) c (F) a (M) g (M) a (M) g (M) u (F) u (F) g aa (M) a (M) g (M) a (M) a (M) sac (F) c (F) c (F) a (M) a (M) a (M) u (F) a (M) a (M) g (M) u (F) g (M) u (F) g (M) c (F) g (M) c (F) a (M) c (F) -idT	26
26 (40)	idT-g (M) g (M) ga (M) g (M) a (M) c (M) u (F) c (F) g (M) c (F) c (F) a (M) g (M) a (M) g (M) u (F) u (F) g aa (M) a (M) g (M) a (M) a (M) asc (F) c (F) c (F) a (M) a (M) a (M) u (F) a (M) a (M) g (M) u (F) g (M) u (F) g (M) c (F) g (M) c (F) a (M) c (F) -idT	26
26 (41)	idT-g (M) g (M) ga (M) g (M) a (M) c (F) u (F) c (F) g (M) c (F) c (F) a (M) g (M) a (M) g (M) u (F) u (F) g aa (M) a (M) g (M) a (M) a (M) ac (F) c (F) Ca (M) a (M) a (M) u (F) a (M) a (M) g (M) Tg (M) u (F) g (M) c (F) g (M) c (F) a (M) c (F) -idT	26
26 (42)	idT-g (M) g (M) ga (M) g (M) a (M) c (F) u (F) Cg (M) c (F) c (F) a (M) g (M) a (M) g (M) u (F) u (F) ga a (M) a (M) g (M) a (M) a (M) ac (F) c (F) Ca (M) a (M) a (M) Ta (M) a (M) g (M) Tg (M) u (F) g (M) c (F) g (M) c (F) a (M) c (F) -idT	26
26 (43)	idT-g (M) g (M) ga (M) g (M) a (M) CTCg (M) CCa (M) g (M) a (M) g (M) Tu (F) gaa (M) a (M) g (M) a (M) a (M) ac (F) c (F) Ca (M) a (M) a (M) Ta (M) a (M) g (M) Tg (M) u (F) g (M) c (F) g (M) c (F) a (M) C -idT	26
26 (44)	idT-g (M) g (M) ga (M) g (M) a (M) c (M) u (F) c (F) g (M) c (M) c (M) a (M) g (M) a (M) g (M) u (M) u (F) g aa (M) a (M) g (M) a (M) a (M) ac (F) c (F) c (F) a (M) a (M) a (M) u (M) a (M) a (M) g (M) u (F) g (M) u (F) g (M) c (F) g (M) c (F) a (M) c (M) -idT	26

[Tabla 1-9]

ID de aptámero	aptámero preparado	SEQ ID NO:
26 (45)	idT-g (M) g (M) ga (M) g (M) a (M) c (M) u (F) c (M) g (M) c (M) c (M) a (M) g (M) a (M) g (M) u (M) u (F) g aa (M) a (M) g (M) a (M) a (M) ac (F) c (F) c (F) a (M) a (M) a (M) u (M) a (M) a (M) g (M) u (F) g (M) u (F) g (M) c (F) g (M) c (F) a (M) c (M) -idT	26
26 (46)	idT-g (M) g (M) ga (M) g (M) a (M) c (M) u (M) c (F) g (M) c (M) c (M) a (M) g (M) a (M) g (M) u (M) u (F) g aa (M) a (M) g (M) a (M) a (M) ac (F) c (F) c (F) a (M) a (M) a (M) u (M) a (M) a (M) g (M) u (F) g (M) u (F) g (M) c (F) g (M) c (F) a (M) c (M) -idT	26
26 (47)	idT-g (M) g (M) ga (M) g (M) a (M) c (M) u (F) c (F) g (M) c (M) c (M) a (M) g (M) a (M) g (M) u (M) u (F) g aa (M) a (M) g (M) a (M) a (M) ac (F) c (F) c (F) a (M) a (M) a (M) u (M) a (M) a (M) g (M) u (M) g (M) u (F) g (M) c (F) g (M) c (F) a (M) c (M) -idT	26
26 (48)	idT-g (M) g (M) ga (M) g (M) a (M) c (M) u (F) c (F) g (M) c (M) c (M) a (M) g (M) a (M) g (M) u (M) u (M) g aa (M) a (M) g (M) a (M) a (M) ac (F) c (F) c (F) a (M) a (M) a (M) u (M) a (M) a (M) g (M) u (M) g (M) u (F) g (M) c (F) g (M) c (F) a (M) c (M) -idT	26
26 (49)	idT-g (M) g (M) ga (M) g (M) a (M) c (M) u (M) c (M) g (M) c (M) c (M) a (M) g (M) a (M) g (M) u (M) u (M) g aa (M) a (M) g (M) a (M) a (M) ac (F) c (F) c (F) a (M) a (M) a (M) u (M) a (M) a (M) g (M) u (M) g (M) u (F) g (M) c (F) g (M) c (F) a (M) c (M) -idT	26
26 (50)	idT-g (M) g (M) ga (M) g (M) a (M) c (M) TCg (M) c (M) c (M) a (M) g (M) a (M) g (M) u (M) u (F) gaa (M) a (M) g (M) a (M) a (M) ac (F) c (F) Ca (M) a (M) a (M) u (M) a (M) a (M) g (M) Tg (M) u (F) g (M) c (F) g (M) c (F) a (M) c (M) -idT	26
26 (51)	idT-g (M) g (M) ga (M) g (M) a (M) c (M) u (M) c (M) g (M) c (M) c (M) a (M) g (M) a (M) g (M) u (M) u (M) g aa (M) a (M) g (M) a (M) a (M) a (M) c (F) c (F) c (F) a (M) a (M) a (M) u (M) a (M) a (M) g (M) u (M) g (M) u (F) g (M) c (F) g (M) c (F) a (M) c (M) -idT	26

[Tabla 1-10]

ID de aptámero	aptámero preparado	SEQ ID NO:
26 (52)	idT-g (M) g (M) ga (M) g (M) a (M) c (M) u (M) c (M) g (M) c (M) c (M) a (M) g (M) a (M) g (M) u (M) u (M) g aa (M) a (M) g (M) a (M) a (M) ac (F) c (F) c (F) a (M) a (M) a (M) u (M) a (M) a (M) g (M) u (M) g (M) u (M) g (M) c (F) g (M) c (F) a (M) c (M) -idT	26
26 (53)	idT-g (M) g (M) ga (M) g (M) a (M) c (M) u (M) c (M) g (M) c (M) c (M) a (M) g (M) a (M) g (M) u (M) u (M) g aa (M) a (M) g (M) a (M) a (M) Ac (F) c (F) c (F) a (M) a (M) a (M) u (M) a (M) a (M) g (M) u (M) g (M) u (F) g (M) c (F) g (M) c (F) a (M) c (M) -idT	26
26 (54)	idT-g (M) g (M) ga (M) g (M) a (M) c (M) u (M) c (M) g (M) c (M) c (M) a (M) g (M) a (M) g (M) u (M) u (M) g aa (M) a (M) g (M) a (M) a (M) aCc (F) Ca (M) a (M) a (M) u (M) a (M) a (M) g (M) u (M) g (M) u (F) g (M) c (F) g (M) c (F) a (M) c (M) -idT	26
26 (55)	idT-g (M) g (M) ga (M) g (M) a (M) c (M) u (M) c (M) g (M) c (M) c (M) a (M) g (M) a (M) g (M) u (M) u (M) g aa (M) a (M) g (M) a (M) a (M) ac (F) c (F) Ca (M) a (M) a (M) u (M) a (M) a (M) g (M) u (M) g (M) Tg (M) c (F) g (M) c (F) a (M) c (M) -idT	26
26 (56)	idT-g (M) g (M) ga (M) g (M) a (M) c (M) u (M) c (M) g (M) c (M) c (M) a (M) g (M) a (M) g (M) u (M) u (M) g aa (M) a (M) g (M) a (M) a (M) ac (F) c (F) Ca (M) a (M) a (M) u (M) a (M) a (M) g (M) u (M) g (M) Ug (M) c (F) g (M) c (F) a (M) c (M) -idT	26
26 (57)	idT-g (M) g (M) ga (M) g (M) a (M) c (M) u (M) c (M) g (M) c (M) c (M) a (M) g (M) a (M) g (M) u (M) u (M) g aa (M) a (M) g (M) a (M) a (M) ac (F) c (F) Ca (M) a (M) a (M) u (M) a (M) a (M) g (M) u (M) g (M) u (F) g (M) Cg (M) c (F) a (M) c (M) -idT	26

[Tabla 1-11]

ID de aptámero	aptámero preparado	SEQ ID NO:
26 (58)	idT-g (M) g (M) ga (M) g (M) a (M) c (M) u (M) c (M) g (M) c (M) c (M) a (M) g (M) a (M) g (M) u (M) u (M) g aa (M) a (M) g (M) a (M) a (M) ac (F) c (F) Ca (M) a (M) a (M) u (M) a (M) a (M) g (M) u (M) g (M) u (F) g (M) c (F) g (M) Ca (M) c (M) -idT	26

ES 2 567 270 T3

ID de aptámero	aptámero preparado	SEQ ID NO:
26 (59)	idT-g (M) g (M) g (F) a (M) g (M) a (M) c (M) u (M) c (M) g (M) c (M) c (M) a (M) g (M) a (M) g (M) u (M) u (M) gaa (M) a (M) g (M) a (M) a (M) ac (F) c (F) c (F) a (M) a (M) a (M) u (M) a (M) a (M) g (M) u (M) g (M) u (F) g (M) c (F) g (M) c (F) a (M) c (M) -idT	26
26 (60)	idT-g (M) g (M) ga (M) g (M) a (M) c (M) u (M) c (M) g (M) c (M) c (M) a (M) g (M) a (M) g (M) u (M) u (M) g aa (M) a (M) g (M) a (M) a (M) a (F) c (F) c (F) c (F) a (M) a (M) a (M) u (M) a (M) a (M) g (M) u (M) g (M) u (F) g (M) c (F) g (M) c (F) a (M) c (M) -idT	26
26 (61)	idT-g (M) g (M) ga (M) g (M) a (M) c (M) u (M) c (M) g (M) c (M) c (M) a (M) g (M) a (M) g (M) u (M) u (M) g aa (M) a (M) g (M) a (M) a (M) ac (F) c (F) c (L) a (M) a (M) a (M) u (M) a (M) a (M) g (M) u (M) g (M) u (F) g (M) c (F) g (M) c (F) a (M) c (M) -idT	26
26 (62)	idT-g (M) g (M) ga (M) g (M) a (M) c (M) u (M) c (M) g (M) c (M) c (M) a (M) g (M) a (M) g (M) u (M) u (M) g aa (M) a (M) g (M) a (M) a (M) a (L) c (F) c (F) c (F) a (M) a (M) a (M) u (M) a (M) a (M) g (M) u (M) g (M) u (F) g (M) c (F) g (M) c (F) a (M) c (M) -idT	26
26 (63)	idT-g (M) g (M) ga (M) g (M) a (M) c (M) u (M) c (M) g (M) c (M) c (M) a (M) g (M) a (M) g (M) u (M) u (M) g aa (M) a (M) g (M) a (M) a (M) aCc (F) Ca (M) a (M) a (M) u (M) a (M) a (M) g (M) u (M) g (M) u (M) g (M) c (F) g (M) c (F) a (M) c (M) -idT	26

[Tabla 1-12]

ID de aptámero	aptámero preparado	SEQ ID NO:
26 (64)	PEG80TS4-Ta-g (M) g (M) ga (M) g (M) a (M) c (M) u (M) c (M) g (M) c (M) c (M) a (M) g (M) a (M) g (M) u (M) u (M) gaa (M) a (M) g (M) a (M) a (M) ac (F) c (F) c (F) a (M) a (M) a (M) u (M) a (M) a (M) g (M) u (M) g (M) u (M) g (M) c (F) g (M) c (F) a (M) c (M) -idT	26
26 (65)	PEG80TS4-Ta-g (M) g (M) ga (M) g (M) a (M) c (M) u (M) c (M) g (M) c (M) c (M) a (M) g (M) a (M) g (M) u (M) u (M) gaa (M) a (M) g (M) a (M) a (M) aCc (F) Ca (M) a (M) a (M) a (M) u (M) a (M) a (M) g (M) u (M) g (M) u (M) g (M) c (F) g (M) c (F) a (M) c (M) -idT	26

ES 2 567 270 T3

ID de aptámero	aptámero preparado	SEQ ID NO:
26 (66)	PEG40GS2-Ta-g (M) g (M) ga (M) g (M) a (M) c (F) u (F) c (F) g (M) c (F) c (F) a (M) g (M) a (M) g (M) u (F) u (F) gaa (M) a (M) g (M) a (M) a (M) ac (F) c (F) c (F) a (M) a (M) a (M) u (F) a (M) a (M) g (M) u (F) g (M) u (F) g (M) c (F) g (M) c (F) a (M) c (F) -i dT	26
26 (67)	PEG40TS2-Ta-g (M) g (M) ga (M) g (M) a (M) c (F) u (F) c (F) g (M) c (F) c (F) a (M) g (M) a (M) g (M) u (F) u (F) gaa (M) a (M) g (M) a (M) a (M) ac (F) c (F) c (F) a (M) a (M) a (M) u (F) a (M) a (M) g (M) u (F) g (M) u (F) g (M) c (F) g (M) c (F) a (M) c (F) -i dT	26
26 (68)	PEG80TS2-Ta-g (M) g (M) ga (M) g (M) a (M) c (F) u (F) c (F) g (M) c (F) c (F) a (M) g (M) a (M) g (M) u (F) u (F) gaa (M) a (M) g (M) a (M) a (M) ac (F) c (F) c (F) a (M) a (M) a (M) u (F) a (M) a (M) g (M) u (F) g (M) u (F) g (M) c (F) g (M) c (F) a (M) c (F) -i dT	26
26 (69)	PEG40TS4-Ta-g (M) g (M) ga (M) g (M) a (M) c (F) u (F) c (F) g (M) c (F) c (F) a (M) g (M) a (M) g (M) u (F) u (F) gaa (M) a (M) g (M) a (M) a (M) ac (F) c (F) c (F) a (M) a (M) a (M) u (F) a (M) a (M) g (M) u (F) g (M) u (F) g (M) c (F) g (M) c (F) a (M) c (F) -i dT	26

[Tabla 1-13]

ID de aptámero	aptámero preparado	SEQ ID NO:
26 (70)	PEG80TS4-Ta-g (M) g (M) ga (M) g (M) a (M) c (F) u (F) c (F) g (M) c (F) c (F) a (M) g (M) a (M) g (M) u (F) u (F) gaa (M) a (M) g (M) a (M) a (M) ac (F) c (F) c (F) a (M) a (M) a (M) u (F) a (M) a (M) g (M) u (F) g (M) u (F) g (M) c (F) g (M) c (F) a (M) c (F) -i dT	26
26 (71)	PEG80TS4-Tb-g (M) g (M) ga (M) g (M) a (M) c (M) u (M) c (M) g (M) c (M) c (M) a (M) g (M) a (M) g (M) u (M) u (M) gaa (M) a (M) g (M) a (M) a (M) ac (F) c (F) c (F) a (M) a (M) a (M) u (M) a (M) a (M) g (M) u (M) g (M) u (M) g (M) c (F) g (M) c (F) a (M) c (M) -i dT	26
26 (72)	PEG80TS4-Tb-g (M) g (M) ga (M) g (M) a (M) c (M) u (M) c (M) g (M) c (M) c (M) a (M) g (M) a (M) g (M) u (M) u (M) gaa (M) a (M) g (M) a (M) a (M) aCc (F) Ca (M) a (M) a (M) u (M) a (M) a (M) g (M) u (M) g (M) u (M) g (M) c (F) g (M) c (F) a (M) c (M) -idT	26

ES 2 567 270 T3

ID de aptámero	aptámero preparado	SEQ ID NO:
27	gggagac (F) u (F) c (F) gc (F) agagu (F) u (F) ga aagaaac (F) c (F) c (F) aaau (F) aaagu (F) gu (F) gc (F) gc (F) ac (F) a	27
28	gggagac (F) u (F) c (F) gc (F) agagu (F) u (F) ga aagaaac (F) c (F) c (F) aaau (F) aagu (F) gu (F) gc (F) gc (F) ac (F)	28
29	gggagac (F) u (F) c (F) gc (F) c (F) agagu (F) u (F) gaaagaaac (F) c (F) c (F) aaau (F) agu (F) g u (F) gc (F) qc (F) ac (F)	29
29 (1)	idT-g (M) g (M) ga (M) g (M) a (M) c (F) u (F) c (F) g (M) c (F) c (F) a (M) g (M) a (M) g (M) u (F) u (F) g aa (M) a (M) g (M) a (M) a (M) a (M) c (F) c (F) c (F) a (M) a (M) a (M) u (F) a (M) g (M) u (F) g (M) u (F) g (M) c (F) g (M) c (F) a (M) c (F) -idT	29
30	gggagac (F) u (F) c (F) gc (F) agagu (F) u (F) ga aagaaac (F) c (F) c (F) aaau (F) agu (F) gu (F) g c (F) gc (F) ac (F)	30
31	gggagaac (F) u (F) u (F) c (F) gac (F) c (F) agaa gu (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) g u (F) gc (F) qc (F) au (F) ac (F) au (F) ggau (F)	31

[Tabla 1-14]

ID de aptámero	aptámero preparado	SEQ ID NO:
32	gggagaac (F) u (F) u (F) c (F) gac (F) c (F) agaa gu (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) g u (F) qc (F) gc (F) au (F) ac (F) a	32
33	gggagaac (F) u (F) u (F) c (F) gac (F) c (F) agaa gu (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) g u (F) gc (F) gc (F) au (F) ac (F) au (F) ggau (F) c (F) c (F) u (F)	33
34	gggagaac (F) u (F) u (F) c (F) gac (F) c (F) agaa gu (F) c (F) gau (F) aac (F) gaac (F) aaaac (F) u (F) c (F) c (F) c (F) aaaggaau (F) au (F) gu (F) g c (F) gc (F) au (F) ac (F) a	34
35	gggagaac (F) u (F) u (F) c (F) gac (F) c (F) agaa gu (F) c (F) gau (F) aac (F) gaac (F) aaaac (F) u (F) c (F) c (F) c (F) aaaggu (F) au (F) au (F) gu (F) gc (F) gc (F) au (F) ac (F) a	35

ES 2 567 270 T3

ID de aptámero	aptámero preparado	SEQ ID NO:
36	gggagaac (F) u (F) u (F) c (F) gac (F) c (F) agaa gu (F) c (F) gau (F) aac (F) gaac (F) aaaac (F) u (F) c (F) c (F) c (F) aaaaau (F) au (F) au (F) gu (F) gc (F) gc (F) au (F) ac (F) a	36
37	gggagaac (F) u (F) u (F) c (F) gac (F) c (F) agaa gu (F) c (F) gau (F) aac (F) gaac (F) aaaac (F) u (F) c (F) c (F) c (F) ggaau (F) au (F) au (F) gu (F) gc (F) gc (F) au (F) ac (F) a	37
38	gggagaac (F) u (F) u (F) c (F) gac (F) c (F) agaa gu (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) g u (F) gc (F) gc (F) au (F) ac (F)	38
39	gggagaac (F) u (F) u (F) c (F) gac (F) c (F) agaa gu (F) c (F) gau (F) aac (F) gaac (F) aaaac (F) u (F) c (F) c (F) c (F) aaaggaaau (F) gu (F) gc (F) gc (F) au (F) ac (F) a	39
40	gggagaac (F) u (F) u (F) c (F) gac (F) c (F) agaa gu (F) c (F) gau (F) aac (F) gaac (F) aaaac (F) u (F) c (F) c (F) c (F) aaau (F) au (F) au (F) gu (F) gc (F) gc (F) au (F) ac (F) a	40

[Tabla 1-15]

ID de aptámero	aptámero preparado	SEQ ID NO:
41	gggagaac (F) u (F) u (F) c (F) gac (F) c (F) agaa gu (F) c (F) gau (F) aac (F) gaac (F) aaaac (F) u (F) c (F) c (F) c (F) aaaggu (F) aaau (F) gu (F) gc (F) gc (F) au (F) ac (F) a	41
42	gggagaac (F) u (F) u (F) c (F) gac (F) c (F) agaa gu (F) c (F) gau (F) aac (F) gaac (F) aaaac (F) u (F) c (F) c (F) c (F) ggaau (F) aaau (F) gu (F) gc (F) gc (F) au (F) ac (F) a	42
43	gggagaac (F) u (F) u (F) c (F) gac (F) c (F) agaa gu (F) c (F) gau (F) aac (F) gaac (F) aaaac (F) u (F) c (F) c (F) c (F) aaau (F) au (F) gu (F) gc (F) gc (F) au (F) ac (F) a	43
44	gggagaac (F) u (F) u (F) c (F) gac (F) c (F) agaa gu (F) c (F) gau (F) aac (F) gaac (F) aaaac (F) u (F) c (F) c (F) c (F) aaaggau (F) gu (F) gc (F) gc (F) au (F) ac (F) a	44

ES 2 567 270 T3

ID de aptámero	aptámero preparado	SEQ ID NO:
45	gggagaac (F) u (F) u (F) c (F) gac (F) c (F) agaa gu (F) c (F) gau (F) aac (F) gaac (F) aaaac (F) u (F) c (F) c (F) c (F) aaau (F) au (F) gu (F) gc (F) qc (F) au (F) ac (F) a	45
46	gggagaac (F) u (F) u (F) c (F) gac (F) c (F) agaa gu (F) c (F) gau (F) aac (F) gaac (F) aaaac (F) u (F) c (F) c (F) c (F) aaau (F) au (F) gu (F) gc (F) qc (F) au (F) ac (F)	46
47	gggagaac (F) u (F) u (F) c (F) gac (F) c (F) agag u (F) c (F) gau (F) aac (F) gaac (F) aaaac (F) u (F) c (F) c (F) c (F) aaau (F) au (F) gu (F) gc (F) qc (F) au (F) ac (F) a	47
48	gggagaac (F) u (F) u (F) c (F) gac (F) c (F) agag u (F) c (F) gau (F) aac (F) gaac (F) aaaac (F) u (F) c (F) c (F) c (F) aaau (F) au (F) gu (F) gc (F) qc (F) au (F) ac (F)	48
49	gggagaac (F) u (F) u (F) c (F) gac (F) c (F) agaa gu (F) c (F) gau (F) aac (F) gaac (F) aaaac (F) u (F) c (F) c (F) c (F) aaau (F) au (F) gu (F) gc (F) g c (F) au (F) ac (F) a	49

[Tabla 1-16]

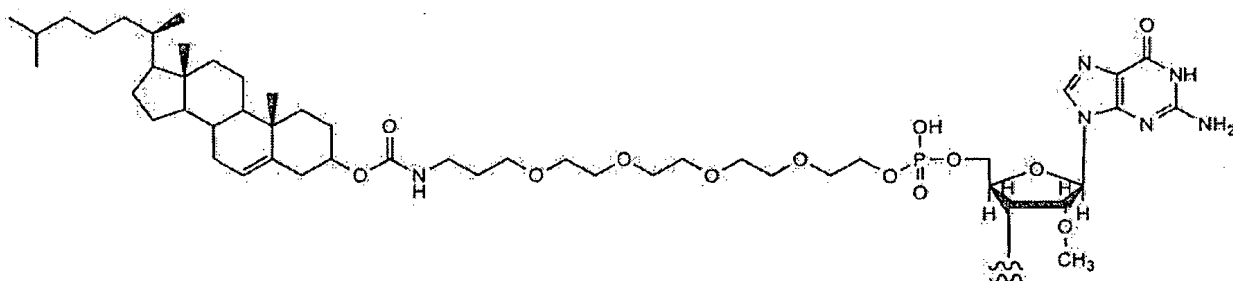
ID de aptámero	aptámero preparado	SEQ ID NO:
50	gggagaac (F) u (F) u (F) c (F) gac (F) c (F) agag u (F) c (F) gau (F) aac (F) gaac (F) aaaac (F) u (F) c (F) c (F) c (F) aaau (F) au (F) gu (F) gc (F) g c (F) au (F) ac (F)	50
51	gggagaac (F) u (F) u (F) c (F) gac (F) c (F) agagu (F) c (F) gau (F) aac (F) gaac (F) aaaac (F) u (F) c (F) c (F) aaau (F) au (F) gu (F) gc (F) gc (F) au (F) ac (F)	51
52	gggagaac (F) u (F) u (F) c (F) gac (F) c (F) agaa gu (F) u (F) u (F) gaaaaaac (F) c (F) c (F) aaau (F) u (F) aaagu (F) au (F) gu (F) gc (F) gc (F) au (F) ac (F) a	52
53	gggagaac (F) u (F) u (F) c (F) gac (F) c (F) agag u (F) c (F) gagagc (F) gaaagaaac (F) u (F) c (F) c (F) c (F) aaau (F) au (F) gu (F) gc (F) gc (F) au (F) ac (F)	53

ID de aptámero	aptámero preparado	SEQ ID NO:
54	gggagaac (F) u (F) u (F) c (F) gac (F) c (F) agaa gau (F) u (F) u (F) gaaaaaac (F) c (F) c (F) aaa u (F) u (F) aaagu (F) au (F) gu (F) gc (F) gc (F) a u (F) ac (F) a	54

(2) Producción de aptámero con colesterol añadido

Basándose en el aptámero mostrado por SEQ ID NO: 30 (6) descrito en el documento PCT/JP09/066457, se produjo un aptámero con colesterol añadido en el extremo 5' terminal. El aptámero con colesterol añadido fue producido por síntesis química mediante un método de fosforamidita. Como colesterol, se utilizó colesterol amidita fabricada por ChemGenes (colesterol TEG, no DMT, CLP-2704).

A continuación se muestra un ejemplo de la estructura del aptámero con colesterol añadido obtenido.



Los aptámeros obtenidos de hecho, representados por las IDs de aptámero: 55 - 63 se muestran en la siguiente Tabla 2. A menos que se indique de forma particular, la unión entre los nucleótidos es un enlace fosfodiéster. Las letras minúsculas indican ARN, las letras mayúsculas ADN. Los paréntesis en el nucleótido indican una modificación en la posición 2' de la ribosa, F indica un átomo de flúor, M indica un grupo O-metilo. s indica un enlace fosforotioato. Por ejemplo, g (M) sT indicado a continuación significa que T y g, en donde la posición 2' se modifica con un grupo O-metilo, están unidos por un enlace fosforotioato. Chol indica colesterol, e idT indica dT invertida. Los aptámeros representados por las IDs de aptámero: 55 - 63 tienen característicamente colesterol en el extremo terminal 5'.

[Tabla 2-1]

ID de aptámero	aptámero preparado	SEQ ID NO:
55	Chol-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	55
56	Chol-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) Ta (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	56
57	Chol-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) Tu (F) u (F) g (M) a (M) Ta (M) a (M) a (M) c (F) a (M) c (F) c (F) u (F) g u (F) a (M) u (F) u (F) a (M) a (M) a (F) a (F) c (F) c (F) c (F) -idT	57

ES 2 567 270 T3

ID de aptámero	aptámero preparado	SEQ ID NO:
57 (1)	Chol-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) sTu (F) u (F) g (M) a (M) Ta (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	57
57 (2)	Chol-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) Tsu (F) u (F) g (M) a (M) Ta (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	57
57 (3)	Chol-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) Tu (F) u (F) g (M) s a (M) Ta (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	57
57 (4)	Chol-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) Tu (F) u (F) g (M) a (M) sTa (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	57
57 (5)	Chol-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) Tu (F) u (F) g (M) a (M) Tsa (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	57

[Tabla 2-2]

ID de aptámero	aptámero preparado	SEQ ID NO:
57 (6)	Chol-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) Tu (F) u (F) g (M) a (M) Ta (M) sa (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	57
57 (7)	Chol-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) Tu (F) u (F) g (M) a (M) Ta (M) a (M) sa (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	57
57 (8)	Chol-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) Tu (F) u (F) g (M) a (M) Ta (M) a (M) a (M) sc (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	57

ID de aptámero	aptámero preparado	SEQ ID NO:
57 (9)	Chol-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) Tu (F) u (F) g (M) a (M) Ta (M) a (M) a (M) c (F) a (M) c (F) c (F) u (F) s gu (F) a (M) u (F) u (F) a (M) a (M) a (F) a (F) c (F) c (F) c (F) -idT	57
58	Chol-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) Ta (M) a (M) a (M) c (F) a (M) c (F) c (F) u (F) gu (F) a (M) u (F) Ta (M) a (M) a (F) a (F) c (F) c (F) c (F) -idT	58
59	Chol-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) Ta (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-idT	59
60	Chol-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) Tu (F) u (F) g (M) a (M) Ta (M) u (F) a (M) c (F) a (M) c (F) c (F) u (F) g u (F) a (M) u (F) u (F) a (M) a (M) a (F) a (F) c (F) c (F) c (F) -idT	60
61	Chol-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) Tu (F) u (F) g (M) a (M) Ta (M) a (M) a (M) c (F) a (M) c (F) c (F) u (F) g u (F) a (M) u (F) u (F) a (M) a (M) aa (F) c (F) c (F) c (F) -idT	61

[Tabla 2-4]

ID de aptámero	aptámero preparado	SEQ ID NO:
62	Chol-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) Tu (F) u (F) g (M) a (M) Ta (M) a (M) a (M) c (F) a (M) c (F) c (F) u (F) g u (F) a (M) u (F) u (F) a (M) a (M) a (F) ac (F) c (F) c (F) -idT	62
63	Chol-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) Tu (F) u (F) g (M) a (M) Ta (M) a (M) a (M) c (F) a (M) c (F) c (F) u (F) g u (F) a (M) u (F) u (F) a (M) a (M) aac (F) c (F) c (F) -idT	63

Ejemplo 2: Aptámero de ARN unido a FCN

- 5 La actividad de unión a FCN de los aptámeros representados por las IDs de aptámero: 1 - 63 preparados en el Ejemplo 1 (excluyendo las IDs de aptámero: 26 (16), (17), (64) - (72), que son aptámeros PEGilados), se evaluó mediante un método de resonancia de plasmón superficial.

Como aparato de medición, se utilizó BIAcore2000 fabricado por BIAcore y como chip sensor se utilizó CM5, que reacciona un grupo amino. El FCN humano se disolvió en solución de inmovilización (acetato de sodio 10 mM, pH 6) a 25 - 40 µg/ml. Para la reacción de un grupo amino en el lado de la proteína y un grupo carboxilo en el lado del chip, se utilizaron clorhidrato de etil-3-carbodiimida y N-hidroxisuccinimida. Después de la reacción, se llevó a cabo el bloqueo con etanolamina-HCl. La cantidad inmovilizada de FCN se ajustó a 3.000 - 4.000 UR. Un aptámero para analito se preparó a 0,15 µM - 0,5 µM. Como tampón de desarrollo, se usó la solución A. En este caso, la solución A es una solución mixta 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), 0,05% de Tween 20. Como solución de regeneración, se empleó una solución mixta de NaCl 1 M y NaOH 50 mM. El FCN se inmovilizó sobre FC2, y los resultados de FC1 se restaron para proporcionar un sensograma final.

Como resultado de la medición, se constató que todos los aptámeros representados por las IDs de aptámero: 1 - 63 (con exclusión de las IDs de aptámero: 26 (16), 26 (17), 26 (64) - 26 (72), los cuales son aptámeros pegilados) se unían significativamente al FCN. Como un ejemplo de ello, la unión de los aptámeros representados por las IDs de aptámero: 26, 48, 57, y FCN se muestra en la Fig. 1. El aptámero representada por la ID de aptámero: 26 (-) es el aptámero representado por la ID de aptámero: 26, en el que la g 19^a se modifica con O-métilo. Esta g es la que se muestra en la secuencia de consenso a continuación, y se sabe que la modificación de dicha g disminuye notablemente la actividad fisiológica. Lo anterior ha mostrado que los aptámeros representados por las IDs de aptámero: 1 - 63 se unen específicamente a FCN.

Si los aptámeros que se muestran por las IDs de aptámero NOs: 1 - 8, 26 (2), 31 - 38, 52 - 56, 61 y 63 obtenidos en el Ejemplo 1 inhiben la unión entre FCN y el receptor de FCN (TrkA), se determinó usando el método de resonancia de plasmón superficial.

Como se indica en el protocolo de la compañía BIAcore, la proteína A (21181, Pierce) se inmovilizó sobre un chip sensor CM5. Se inmovilizaron aproximadamente 500 a 700 UR de Trk A humana fusionada con la porción Fc de IgG (175-TK, R&D Systems) sobre el mismo. Como analito, una mezcla de FCN (0,1 µM) y cada aptámero (0,2 µM), se inyectó después de dejarla reposar durante 30 minutos. Si el aptámero inhibe la unión entre FCN y TrkA, se espera que no aumente la señal en el sensograma; si el aptámero no inhibe la unión, se formará un complejo triple y se espera que la señal aumente. Cuando el FCN se une más fuertemente a un receptor que a un aptámero, el aptámero se puede retirar y el FCN se puede unir con el receptor. Antes de iniciar el experimento de inhibición, la unión de TrkA y FCN fue confirmada. Usando la cantidad de unión entre FCN y el receptor de FCN sin un aptámero como 100, se determinó la cantidad de unión entre FCN y un receptor de FCN con un aptámero añadido como valor de corrección. En este caso, 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 la finalización de la inyección de FCN). El valor de corrección se restó de 100 para proporcionar un % de actividad inhibitoria, en donde no menos del 90% muestra la presencia de actividad inhibitoria.

Como resultado del experimento, con todos los aptámeros que se muestran con las IDs de aptámero NOs: 1 - 8, 26 (2), 31 - 38, 52 - 56, 61 y 63 se observó que se inhibía la unión entre FCN y TrkA. Un experimento similar se realizó para otro receptor p75 (p75-Fc; R&D Systems). Como resultado, con todos los aptámeros que se muestran con las IDs de aptámero NOs: 26 (2), 56, 61 y 63 obtenidos en el Ejemplo 1, se observó una inhibición de la unión entre FCN y P75 en no menos del 90%.

40 Ejemplo 3: Actividad inhibitoria del crecimiento de neuritas del aptámero

La actividad inhibitoria del crecimiento de neuritas del aptámero obtenido en el Ejemplo 1, se evaluó mediante el uso de la célula Neuroscreen-1, que es un subclon de las células PC-12.

Las células (2500 células por pocillo) se cultivaron durante un día en un medio RPMI-1640 que contenía 2,5% de suero de caballo y 1,25% de suero bovino fetal en una placa de 96 pocillos de fondo plano recubiertos con colágeno de tipo IV. Una solución mixta de FCN humano (concentración final 1,1 nM o 0,38 nM) y un aptámero (concentración final 500 - 0,01 nM), que había reaccionado previamente en un medio RPMI-1640 sin suero, a temperatura ambiente o a 37°C durante 30 min a 1 hora, se añadió. Dos días más tarde, el citoplasma y los núcleos se tiñeron utilizando el kit de crecimiento de neuritas de Cellomics (fabricado por Thermo Scientific), y se midió la longitud de las neuritas por célula mediante el Cellomics ArrayScan VTI (fabricado por Thermo Scientific). Siendo la longitud de las neuritas por célula obtenida con la adición de FCN solo, la actividad inhibitoria del 0%, y siendo la de la célula obtenida mediante cultivo exento de FCN durante 2 días, la actividad inhibitoria del 100%, se calculó la actividad inhibitoria del aptámero a partir de la longitud de la neurita por célula obtenida mediante el cultivo con adición de FCN y el aptámero en mezcla. Cuando la actividad inhibitoria era del 0% o inferior, se indica '0%'. La concentración inhibitoria del 50% (CI50) se determinó a partir de las concentraciones entre dos puntos, que incluyen la actividad inhibitoria del 50%. Los resultados del experimento se muestran en la Tabla 3-1 - 3-3.

En las Tablas 3-1 - 3-4, el valor de CI50 indicado como "<X" significa que la actividad inhibitoria no era inferior al 50% cuando la concentración de X indicada era una concentración mínima medida. Un valor de CI50 indicado como ">X" significa que la actividad inhibitoria no era superior al 50% cuando la concentración de X indicada era la concentración máxima medida. El valor mostrado por * significa una concentración de FCN de 0,38 nM, y otras son

ES 2 567 270 T3

cuando la concentración de FCN era de 1,1 nM. Los valores numéricos en los paréntesis son valores de CI50 que se describen en el documento PCT/JP09/066457.

5 Como resultado, se encontró que muchos de los aptámeros obtenidos tienen actividad de CI50 elevada de 10 nM o inferior, incluyendo aptámeros que muestran una CI50 de 1 nM o inferior y aptámeros que muestran una CI50 de 0,3 nM o inferior. En particular, los aptámeros de las IDs de aptámero: 26 (18) y siguientes mostraron un valor de CI50 que no era superior a 0,3 nM.

[Tabla 3-1]

ID de aptámero	longitud (mero)	CI50 (nM) del Ensayo de Crecimiento de Neuritas
1	64	2,1
2	69	<3,0
3	73	<3,0
4	73	<3,0
5	61	<3,0
6	62	<3,0
7	61	<3,0
8	62	<3,0
9	57	<3,0
10	58	<3,0
11	57	1,5
12	57	1,4
13	56	1,3
14	57	1,2
15	56	1,9
16	56	1,1
17	54	<1,0
18	53	<10
19	52	1,3
20	51	1,0
21	51	1,1
22	49	1,3

ES 2 567 270 T3

ID de aptámero	longitud (mero)	CI50 (nM) del Ensayo de Crecimiento de Neuritas
23	50	<1,0
24	49	<1,0
25	47	<1,0
26	45	<1,0
26 (1)	45	0,06*
26 (2)	45	0,06*
26 (3)	45	<1,0
26 (4)	45	<1,0
26 (5)	45	<1,0
26 (6)	45	<1,0
26 (7)	45	<1,0
26 (8)	45	<1,0
26 (9)	45	0,052*
26 (10)	45	0,047*
26 (11)	45	0,087*
26 (12)	45	0,036*
26 (13)	45	0,039*
26 (14)	45	0,082*
26 (15)	45	0,067*
26 (16)	45	<0,1 *
26 (17)	45	<0,1 *

[Tabla 3-2]

ID de aptámero	longitud (mero)	CI50 (nM) del Ensayo de Crecimiento de Neuritas
26 (18)	45	0,084*
26 (19)	45	Lt; 0,01 *
26 (20)	45	0,016*

ES 2 567 270 T3

ID de aptámero	longitud (mero)	CI50 (nM) del Ensayo de Crecimiento de Neuritas
26 (21)	45	0,283*
26 (22)	45	0,293*
26 (23)	45	0,229*
26 (24)	45	0,226*
26 (25)	45	0,29*
26 (26)	45	0,285*
26 (27)	45	0,150*
26 (28)	45	0,200*
26 (29)	45	0,138*
26 (30)	45	0,289*
26 (31)	45	0,300*
26 (32)	45	0,220*
26 (33)	45	0,294*
26 (34)	45	0,247*
26 (35)	45	0,166*
26 (36)	45	0,211*
26 (37)	45	0,181*
26 (38)	45	0,145*
26 (39)	45	0,168*
26 (40)	45	0,247*
26 (41)	45	0,104*
26 (42)	45	0,083*
26 (43)	45	0,073*
26 (44)	45	0,074*
26 (45)	45	0,238*
26 (46)	45	0,097*

ES 2 567 270 T3

ID de aptámero	longitud (mero)	CI50 (nM) del Ensayo de Crecimiento de Neuritas
26 (47)	45	0,065*
26 (48)	45	0,053*
26 (49)	45	0,059*
26 (50)	45	0,046*
26 (51)	45	0,191*
26 (52)	45	0,101*
26 (53)	45	0,128*
26 (54)	45	0,097*
26 (55)	45	0,087*
26 (56)	45	0,154*
26 (57)	45	0,213*
26 (58)	45	0,143*
26 (59)	45	0,170*

[Tabla 3-3]

ID de aptámero	longitud (mero)	CI50 (nM) del Ensayo de Crecimiento de Neuritas
26 (60)	45	0,105*
26 (61)	45	0,112*
26 (62)	45	0,228*
26 (63)	45	0,139*
26 (64)	45	0,102*
26 (65)	45	0,091*
26 (66)	45	0,252*
26 (67)	45	0,153*
26 (68)	45	0,128*
26 (69)	45	0,157*
26 (70)	45	0,126*

ES 2 567 270 T3

ID de aptámero	longitud (mero)	CI50 (nM) del Ensayo de Crecimiento de Neuritas
26 (71)	45	0,279*
26 (72)	45	0,219*
27	46	<1,0
28	44	<1,0
29	44	<0,3 *
29 (1)	44	0,058*
30	43	<0,3 *
31	69	<3,0
32	64	1,0
33	72	<3,0
34	62	<3,0
35	62	<3,0
36	62	<3,0
37	61	<3,0
38	63	<3,0
39	61	<3,0
40	60	<3,0
41	61	<3,0
42	60	<3,0
43	58	<3,0
44	59	<3,0
45	59	<3,0
46	57	2,6
47	57	2,5
48	56	1,8
49	57	1,8

ES 2 567 270 T3

ID de aptámero	longitud (mero)	CI50 (nM) del Ensayo de Crecimiento de Neuritas
50	55	2,6
51	54	2,7
52	57	5,9
53	56	4,7
54	58	3,0

[Tabla 3-4]

ID de aptámero	longitud (mero)	CI50 (nM) del Ensayo de Extensión de Neuritas
55	41	9,8
56	41	4,1
57	41	<3,0
57 (1)	41	<3,0
57 (2)	41	<3,0
57 (3)	41	<3,0
57 (4)	41	<3,0
57 (5)	41	<3,0
57 (6)	41	<3,0
57 (7)	41	<3,0
57 (8)	41	<3,0
57 (9)	41	<3,0
58	41	5,4
59	41	6,9
60	41	<3,0
61	41	<3,0
62	41	4,6
63	41	<3,0
PCT/JP09/066457, SEQ ID NO: 62	74	1,9 (2,0)

ID de aptámero	longitud (mero)	CI50 (nM) del Ensayo de Extensión de Neuritas
PCT/JP09/066457, SEQ ID NO: 67	74	2,8 (2,7)
PCT/JP09/066457, SEQ ID NO: 30	41	44,8 (57,6)

Ejemplo 4: Actividad inhibitoria de la proliferación celular del aptámero (ensayo TF-1)

La actividad inhibitoria del aptámero obtenido en el Ejemplo 1 se evaluó mediante un ensayo de inhibición del crecimiento utilizando células TF-1.

- 5 Dos genes del receptor de FCN (TrkA humano y p75 humano) se introdujeron en células TF-1 (número de ATCC: CRL-2003), que es una línea celular eritroleucémica humana, mediante el uso de un vector de retrovirus para proporcionar células que expresan de forma elevada dos receptores de forma simultánea y estable. Las células se suspendieron en medio RPMI-1640 que contenía suero bovino fetal al 20%, y se sembraron en una placa de 96 pocillos de fondo plano blanco, a 1000 células (50 μ L) por pocillo. A esto se añadió una solución mixta de 50 μ L de FCN humano (concentración final de 0,076 nM) y el aptámero (concentración final de 30 - 0,01 nM), que había reaccionado previamente a temperatura ambiente durante 30 min en un medio RPMI-1640 sin suero, 3 días más tarde, se añadieron 100 μ L de reactivo CellTiter-Glo para el ensayo de viabilidad celular CellTiter-Glo Luminescent (fabricado por Promega) a cada pocillo, la quimioluminiscencia se midió mediante un lector de microplacas y el crecimiento de las células TF-1 se evaluó mediante estimulación con FCN. Siendo la cantidad de luminiscencia por pocillo obtenida mediante la adición de FCN solo y el cultivo de las células durante 3 días, la actividad inhibitoria del 0%, y siendo la de la célula obtenida mediante cultivo sin FCN durante 3 días, la actividad inhibitoria del 100%, se calculó la actividad inhibitoria del aptámero a partir de la cantidad de luminiscencia por pocillo obtenida cultivando con la adición de FCN y el aptámero en mezcla. Cuando la actividad inhibitoria era del 0% o inferior, se indica '0%'. La concentración inhibitoria del 50% (CI50) se determinó a partir de las concentraciones entre dos puntos, que incluían la actividad inhibitoria del 50%. Los resultados se muestran en la Tabla 4-1 - 4-3.

El valor de CI50 indicado como "<X" significa que la actividad inhibitoria no era inferior al 50% cuando la concentración X indicada era una concentración mínima medida. El valor de CI50 indicado como ">X" significa que la actividad inhibitoria no era superior al 50% cuando la concentración de X indicada era la concentración máxima medida. Como resultado, se encontró que muchos de los aptámeros obtenidos tienen una actividad de CI50 elevada de 10 nM o inferior, incluyendo aptámeros que muestran una CI50 de 1 nM o inferior y aptámeros que muestran una CI50 de 0,3 nM o inferior. En particular, entre los aptámeros mostrados por las IDs de aptámero: 26 (18) y siguientes, aquellos que no sean el aptámero de las IDs de aptámero: 26 (36), 26 (37), 26 (40), muestran un valor de CI50 que no es superior a 0,3 nM en un experimento de inhibición de la proliferación celular, lo que indica que estos aptámeros tienen una actividad inhibitoria elevada frente a FCN.

30 [Tabla 4-1]

ID de aptámero	longitud (mero)	CI50 (nM) del Ensayo TF-1
1	64	20,4
10	58	11,1
19	52	3,2
20	51	<1,0
21	51	1,0
22	49	5,7
23	50	<1,0
24	49	<1,0
25	47	<1,0

ES 2 567 270 T3

ID de aptámero	longitud (mero)	CI50 (nM) del Ensayo TF-1
26	45	<1,0
26 (1)	45	0,1
26 (2)	45	0,07
26 (3)	45	4,3
26 (4)	45	6,8
26 (5)	45	3,4
26 (6)	45	<1,0
26 (7)	45	2,4
26 (8)	45	> 10
26 (9)	45	0,041
26 (10)	45	0,044
26 (11)	45	0,058
26 (12)	45	0,052
26 (13)	45	0,074
26 (14)	45	0,09
26 (15)	45	0,081
26(16)	45	<0,1
26(17)	45	<0,1
26 (18)	45	0,105
26 (19)	45	0,104
26 (20)	45	0,110
26 (21)	45	0,175
26 (22)	45	0,186
26 (23)	45	0,159
26 (24)	45	0,156
26 (25)	45	0,203

ES 2 567 270 T3

ID de aptámero	longitud (mero)	CI50 (nM) del Ensayo TF-1
26 (26)	45	0,177
26 (27)	45	0,158
26 (28)	45	0,184
26 (29)	45	0,131
26 (30)	45	0,165
26 (31)	45	0,211

[Tabla 4-2]

ID de aptámero	longitud (mero)	CI50 (nM) del Ensayo TF-1
26 (32)	45	0,193
26 (33)	45	0,176
26 (34)	45	0,239
26 (35)	45	0,164
26 (36)	45	> 0,3
26 (37)	45	> 0,3
26 (38)	45	<0,1
26 (39)	45	0,218
26 (40)	45	> 0,3
26 (41)	45	0,100
26 (42)	45	0,073
26 (43)	45	0,128
26 (44)	45	0,061
26 (45)	45	0,146
26 (46)	45	0,100
26 (47)	45	0,074
26 (48)	45	0,069
26 (49)	45	0,062

ES 2 567 270 T3

ID de aptámero	longitud (mero)	CI50 (nM) del Ensayo TF-1
26 (50)	45	0,083
26 (51)	45	0,108
26 (52)	45	0,072
26 (53)	45	0,078
26 (54)	45	0,065
26 (55)	45	0,075
26 (56)	45	0,122
26 (57)	45	0,130
26 (58)	45	0,107
26 (59)	45	0,101
26 (60)	45	0,055
26 (61)	45	0,078
26 (62)	45	0,120
26 (63)	45	0,119
26 (64)	45	0,051
26 (65)	45	0,064
26 (66)	45	0,520
26 (67)	45	0,285
26 (68)	45	0,348
26 (69)	45	0,348
26 (70)	45	0,319
26 (71)	45	0,065
26 (72)	45	0,075

[Tabla 4-3]

ID de aptámero o SEQ ID NO	longitud (mero)	CI50 (nM) del Ensayo TF-1
27	46	3,2

ES 2 567 270 T3

ID de aptámero o SEQ ID NO	longitud (mero)	CI50 (nM) del Ensayo TF-1
28	44	1,4
29	44	1,0
29 (1)	44	0,154
30	43	2,8
32	64	> 30
43	58	> 30
55	41	8,0
57 (1)	41	1,2
57 (2)	41	6,2
57 (3)	41	1,5
57 (4)	41	4,2
57 (5)	41	1,7
57 (6)	41	5,3
57 (7)	41	5,3
57 (8)	41	6,2
57 (9)	41	7,0
60	41	5,4
61	41	1,3
62	41	6,3
63	41	2,1
PCT/JP09/066457, SEQ ID NO: 62	74	6,1
PCT/JP09/066457, SEQ ID NO: 67	74	14,9

Ejemplo 5: Comparación con el aptámero para FCN descrito en la referencia de la técnica anterior

La actividad de unión y la actividad inhibitoria del crecimiento de neuritas del aptámero para FCN descrito en la referencia de la técnica anterior (Binkley J et al., (1995) Nucleic Acids Res. 23, 3198) se compararon.

- 5 Los aptámeros que se describen en la referencia de la técnica anterior eran todos ARNs no modificados, y las secuencias de los mismos no coinciden con las secuencias descritas en la presente memoria descriptiva. H1, L2 y L6 que muestran una actividad de unión elevada se seleccionaron y los aptámeros que se describen en la referencia de la técnica anterior se produjeron mediante transcripción usando polimerasa T7. La actividad de unión se evaluó por

un método similar al del Ejemplo 2. Siendo el 100% el valor obtenido dividiendo el valor máximo de UR cuando el aptámero representado por SEQ ID NO: 57 se une a FCN, por el peso molecular, cuando no era inferior al 80%, se caracterizó con "++", cuando no era inferior al 50%, se caracterizó con "+", cuando no era más del 50%, se caracterizó con "-". Considerando la diferencia en el peso molecular del aptámero, el valor de UR obtenido se modificó dividiendo por el peso molecular. La actividad inhibitoria del crecimiento de neuritas se evaluó por un método similar al del Ejemplo 3. Los resultados se muestran en la Tabla 5.

Como resultado del experimento, L2 y L6 no mostraron una unión remarcable. Cuando se inmovilizó L2 o L6, se observó unión a FCN. Por lo tanto, se considera que la inmovilización de FCN ha disminuido la afinidad de L2 y L6 hacia FCN. En cuanto a la actividad inhibitoria del crecimiento de neuritas, el aptámero de la presente invención muestra actividad inhibitoria del crecimiento de neuritas alta, mientras que H1, L2, L6 se encontró que no inhibían el crecimiento de las neuritas, incluso a 500 nM.

[Tabla 5]

ID de aptámero o aptámero descrito en el documento	actividad de unión	CI50 (nM) del Ensayo de Crecimiento de Neuritas
26 (10)	++	0,047*
57	++	<3
H1	+	> 500
L2	-	> 500
L6	-	> 500

Ejemplo 6: Comparación con el aptámero para FCN descrito en el documento WO02/077262

La actividad de unión, la actividad inhibitoria de crecimiento de neuritas y la actividad inhibitoria de la proliferación celular del aptámero para FCN descrito en el documento WO02/077262, se midieron y se compararon con las del aptámero representado por la ID de aptámero: 26 (19), especificado en la presente invención. Como aptámero para FCN descrito en el documento WO02/077262, se seleccionaron las SEQ ID Nos. 38 y 42. Las secuencias de estos aptámeros son las siguientes, y se producen por el método de la fosforamidita mostrado en el Ejemplo 1. En este caso, se utilizó dU bromada en lugar de T (T = 5-BrdU (5-bromo-2'-desoxiuridina)).

Seq ID No. 38

ATATATATGGGAGGACGATGCGGGCACACTTAAATCCACTTCACCTTACAATTCCTTTATCT
GCAGACGACGAGCGGGAAAAAAA

Seq ID No. 42

ATATATATGGGAGGACGATGCGGGCCCCAACACTTGTTTCCTATCTTTCAACCCCTTGAT
CCAGACGACGAGCGGGAAAAAAA

La actividad de unión se evaluó por un método similar al del Ejemplo 2 y utilizando un método de resonancia de plasmón superficial. Siendo el 100% el valor obtenido dividiendo el valor máximo de UR cuando el aptámero representado por la ID de aptámero: 26 (19) se une a FCN, por el peso molecular, cuando no era inferior a 80%, se caracterizó con "++", cuando era del 79 - 51%, se caracterizó con "+", cuando no era más del 50%, se caracterizó con "-". Considerando la diferencia en el peso molecular del aptámero, el valor de UR obtenido se modificó dividiendo por el peso molecular. La actividad inhibitoria del crecimiento de neuritas y la actividad inhibitoria de la proliferación celular se evaluaron por un método similar al de los Ejemplos 3 y 4. Los resultados se muestran en la Tabla 6.

Como resultado del experimento, se encontró que la actividad de unión del aptámero para FCN descrito en el documento WO02/077262 era extremadamente baja en comparación con el aptámero de la presente invención. En cuanto a la actividad inhibitoria del crecimiento de neuritas y la actividad inhibitoria de la proliferación celular, el aptámero de la presente invención mostró una actividad inhibitoria elevada, mientras que el aptámero descrito en el documento WO02/077262 no mostraba ninguna actividad inhibitoria en absoluto.

[Tabla 6]

aptámero	actividad de unión	CI50 (nM) del Ensayo de Crecimiento de Neuritas	CI50 (nM) del Ensayo TF-1
ID de aptámero: 26 (19)	++	<0:01	0,104
WO02/077262, SEQ ID NO: 38	-	> 200	> 200
WO02/077262, SEQ ID NO: 42	-	> 200	> 200

Ejemplo 7: Reactividad cruzada con otra neurotrofina

- 5 Neurotrofina es un término genérico de la familia de genes relacionados con el FCN, y se conocen otros BDNF (factor neurotrófico derivado del cerebro), NT-3 (neurotrofina-3) y NT-4/5 (neurotrofina-4/5). Como receptor de neurotrofina, se ha identificado el receptor p75 de baja afinidad y el receptor Trk de alta afinidad. Trk también forma una familia que incluye 3 tipos: TrkA que es un receptor de FCN, TrkB que es un receptor de BDNF y NT-4/5, y TrkC que es un receptor de NT-3. El aptámero especificado en la presente invención tiene una actividad de unión elevada a FCN y actividad inhibitoria frente a FCN. Se examinó la actividad en otras neurotrofinas.
- 10 La unión del aptámero representado por la ID de aptámero: 26 (2) y BDNF humano (fabricado por R&D Systems), NT-3 humana (fabricada por R&D Systems), NT-4/5 humana (fabricada por R&D Systems) se evaluó por el método de resonancia de plasmón superficial de la misma manera que en el Ejemplo 2.
- Como resultado, no se observó una unión a NT-3. Se aclaró que la tasa de disociación era muy rápida para BDNF y NT-4/5, y la actividad de unión era claramente inferior a la de FCN.
- 15 La actividad inhibitoria fisiológica de los aptámeros representados por las IDs de aptámero: 26 (2), 52, 63 - 65 frente a BDNF, NT-3, NT-4/5 se evaluó mediante un ensayo de inhibición del crecimiento utilizando células TF-1,
- Los genes del receptor humano (TrkB, TrkC, p75) para los respectivos factores neurotróficos, se introdujeron en células TF-1 (número de ATCC: CRL-2003), que es una línea celular eritroleucémica humana, mediante el uso de un vector retrovirus para proporcionar células que expresan de forma elevada estos receptores de forma estable. Se utilizaron células TF-1 en las que se había introducido TrkB y p75 para la evaluación de la actividad inhibitoria frente a BDNF, se utilizaron células TF-1 en las que se había introducido TrkC y p75 para la evaluación frente a NT-3, y células TF-1 en las que solo se había introducido TrkB se utilizaron para la evaluación frente a NT-4/5. Estas células se suspendieron en un medio RPMI-1640 que contenía suero bovino fetal al 20%, y se sembraron en una placa de 96 pocillos de fondo plano blanco a 1000 células (50 μ L) por pocillo. A esto se añadió una solución mixta de 50 μ L de BDNF humano (concentración final 0,074 nM) o NT-3 (concentración final 0,074 nM) o NT-4/5 (concentración final 0,071 nM) y el aptámero (concentración final de 30 - 0,01 nM), que había reaccionado previamente a temperatura ambiente durante 30 min en un medio RPMI-1640 sin suero, 3 días más tarde, se añadieron 100 μ L de reactivo CellTiter-Glo para el ensayo de viabilidad celular CellTiter-Glo Luminescent (fabricado por Promega) a cada pocillo, la quimioluminiscencia se midió mediante un lector de microplacas. Con la cantidad de luminiscencia por pocillo obtenida por la adición de BDNF o NT-3 o NT-4/5 solo y el cultivo de las células durante 3 días como actividad inhibitoria del 0%, y la de la célula obtenida mediante cultivo durante 3 días sin adición de BDNF o NT-3 o NT-4/5 como actividad inhibitoria del 100%, se calculó la actividad inhibitoria del aptámero a partir de la cantidad de luminiscencia por pocillo obtenida cultivando con la adición de BDNF o NT-3 o NT-4/5 y el aptámero en mezcla. Cuando la actividad inhibitoria era del 0% o inferior, se indica '0%'. La concentración inhibitoria del 50% (CI50) se determinó a partir de las concentraciones entre dos puntos, que incluían la actividad inhibitoria del 50%. Los resultados se muestran en la Tabla 7.
- Un valor de CI50 indicado como ">X" significa que la actividad inhibitoria no era superior al 50% cuando la concentración de X indicada era la concentración máxima medida. Todos los aptámeros medidos mostraban una CI50 que no era inferior a 1000 nM para BDNF y NT-3. Además, la CI50 no era inferior a 300 nM para NT-4/5. Basándose en los resultados anteriores, se encontró que estos aptámeros habían inhibido específicamente a FCN.

[Tabla 7]

ID de aptámero	BDNF (CI50)	NT-3 (CI50)	NT-4/5 (CI50)	FCN (CI50)
26 (2)	> 1000 nM	> 1000 nM	> 300 nM	00:07 nM

ID de aptámero	BDNF (CI50)	NT-3 (CI50)	NT-4/5 (CI50)	FCN (CI50)
26 (52)	> 1000 nM	> 1000 nM	> 300 nM	0,072 nM
26 (63)	> 1000 nM	> 1000 nM	> 300 nM	0,119 nM
26 (64)	> 1000 nM	> 1000 nM	> 300 nM	0,051 nM
26 (65)	> 1000 nM	> 1000 nM	> 300 nM	0,064 nM

Ejemplo 8: Acción analgésica mediante el aptámero para FCN

5 Para estudiar la acción analgésica del aptámero para FCN sobre el dolor inducido por FCN, se utilizó un modelo de hiperalgesia térmica inducida por la administración subcutánea de FCN en la pata trasera de una rata. Para el experimento, se emplearon ratas Jcl:SD (6 semanas de edad). Como índice de la hiperalgesia térmica, se utilizó la latencia de la respuesta del comportamiento de escape frente a una radiación infrarroja de un aparato de medición de la estimulación de calor plantar (fabricado por Ugo Basile) en la planta. El día anterior a la prueba, se realizó la aclimatación al sistema de evaluación. Antes de la administración el día de la prueba, se midió la latencia de la respuesta de escape, y se utilizaron animales que no mostraron menos de 10 s y menos de 20 s. El beta-FCN humano recombinante (R&D Systems, concentración final de 50 µg/ml) y una sustancia del ensayo se mezclaron con vehículo (Tris-HCl 20 mM (pH 7,6), NaCl 145 mM, KCl 5,4 mM, MgCl₂ 0,8 mM, CaCl₂ 1,8 mM, 0,1% de BSA), se incubaron a temperatura ambiente durante 30 min, y se administraron por vía subcutánea a la planta trasera izquierda a 10 µL. La latencia de la respuesta de escape se midió 3 h más tarde y 5 horas más tarde. El aptámero anti-FCN representado por la ID de aptámero: 26 (2) se administró con una concentración final de 0,5, 5, 10 mg/ml (relación molar con respecto al FCN de aproximadamente: 10, 100, 200 veces). Como control, se administró vehículo o una mezcla de vehículo y FCN de la misma manera. Los resultados se muestran en la Tabla 8 (media ± EEM, grupo del vehículo y grupo de FCN: n = 12, grupo de administración de SEQ ID NO: 26 (2): n = 9).

10 Tres y 5 h después de la administración, el grupo de FCN mostraba una latencia de la respuesta de escape significativamente baja en comparación con el grupo del vehículo. Tres horas después de la administración, la latencia de la respuesta de escape del grupo de administración de la ID de aptámero: 26 (2) era significativamente alta (p <0,05) a 5, 10 mg/ml, en comparación con el grupo de administración de FCN solo, y 5 horas después de la administración, la latencia de la respuesta de escape del grupo de administración de la ID de aptámero: 26 (2) era alta (p <0,01) a 0,5, 5, 10 mg/ml, en comparación con el grupo de solo administración de FCN solo. Esto ha puesto de manifiesto que un aptámero anti-FCN tiene una acción analgésica sobre el dolor inducido por FCN.

15 [Tabla 8]

grupo tratado	latencia de la respuesta de escape (s)		
	antes del tratamiento	3 horas más tarde	5 horas más tarde
vehículo	13,58 ± 0,64	12,01 ± 1,64	12,26 ± 0,66
FCN	13,55 ± 0,51	9,88 ± 0,77	8,59 ± 0,47
FCN-0,5 mg/ml de ID de aptámero: 26 (2)	13,78 ± 0,73	11,49 ± 0,76	12,79 ± 0,75
FCN-5 mg/ml de ID de aptámero: 26 (2)	13,21 ± 0,62	12,72 ± 0,71	12,19 ± 0,35
FCN-10 mg/ml de ID de aptámero: 26 (2)	14,49 ± 0,82	12,92 ± 1,71	12,96 ± 0,64

Ejemplo 9: Acción analgésica del aptámero para FCN en el modelo de dolor postoperatorio

30 Para estudiar la eficacia de la terapia del aptámero para FCN, se empleó un modelo de dolor postoperatorio que había inducido hiperalgesia térmica. Para el experimento, se utilizaron ratas Crl:CD(SD) (5 semanas de edad). La punta de un catéter se alojó en la vena femoral, la otra punta se expuso desde la parte posterior de la rata. Una semana más tarde, se estableció un sistema de infusión de conexión rápida (fabricado por Strategic Applications

Incorporated) en la rata, la hiperalgesia térmica se evaluó una semana después. Como índice de la hiperalgesia térmica, se utilizó la latencia de la respuesta del comportamiento de escape a la radiación infrarroja de un aparato de medición de la estimulación de calor plantar (fabricado por Ugo Basile) en la planta. La aclimatación al sistema de evaluación se llevó a cabo 3 días antes del inicio de la prueba. El día de la prueba, se midió la latencia de la respuesta de escape, y se utilizaron los animales que mostraron no menos de 10 s y menos de 20 s. El aptámero anti-FCN representado por la ID de aptámero: 26 (66) se disolvió en solución salina y se administró por vía intravenosa con una bomba de jeringa (fabricada por Terumo Corporation) a 13,61 mg/240 ml/kg/96 h de una manera sostenida (la masa del aptámero se corresponde a la región exenta de PEG). Como control, se administró vehículo de la misma manera. Una hora después del inicio de la administración, se realizó una incisión en la piel y la fascia trasera de la planta derecha, el flexor se dividió verticalmente, y se suturó la piel. La latencia de la respuesta de escape se midió después de la operación de incisión, y 1, 2, 3, 4 días a partir de entonces. Los resultados se muestran en la Tabla 9 (media \pm EEM, n = 9).

El grupo de vehículo mostraba una latencia de la respuesta de escape significativamente baja ($p < 0,01$) 1, 2, 3, 4 días después de la operación de administración-incisión, en comparación a antes de la administración operación de administración-incisión. Los días 1, 2, 3, 4 después de la operación de administración-incisión, la latencia de la respuesta de escape del aptámero (grupo de administración de ID de aptámero: 26 (66)) era significativamente alta (1, 2, 4 días más tarde: $p < 0,01$, 3 días después: $p < 0,05$) en comparación con el grupo de vehículo. Esto ha puesto de manifiesto que un aptámero anti-FCN tiene una acción analgésica en el modelo de dolor postoperatorio.

[Tabla 9]

después de la operación de administración-incisión	latencia de la respuesta de escape (s)	
	vehículo	ID de aptámero: 26 (66)
día 0	13,21 \pm 0,51	13,36 \pm 0,43
día 1	4,97 \pm 0,6	10,02 \pm 1,33
día 2	6,46 \pm 0,71	10,24 \pm 0,63
día 3	6,78 \pm 0,52	10,74 \pm 1,37
día 4	7,08 \pm 1,32	13,01 \pm 1,01

20

Aplicabilidad Industrial

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

25

Esta solicitud se basa en un documento de solicitud de patente nº 2010-068546 presentado en Japón (fecha de presentación: 24 de marzo 2010).

Lista de secuencias

<110> RIBOMIC INC. Shionogi & Co., Ltd.

5 <120> Aptámero para FCN y uso del mismo

<130> 091690

<150> JP2010-068546

10 <151> 2010-03-24

<160> 69

<170> PatentIn version 3.3

15 <210> 1

<211> 64

<212> RNA

<213> Artificial

20 <220>

<223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra FCN

<400> 1

25 **gggagaacuu cgaccagaag uuugaaagaa acccaauua aagugaacag uaugugcgca 60**

uaca 64

<210> 2

<211> 69

30 <212> RNA

<213> Artificial

<220>

<223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra FCN

35 <400> 2

gggagaacuu cgaccagaag uuugaaagaa acccaauua aagugaagua ugugcgcaua 60

cauuccuca 69

40 <210> 3

<211> 73

<212> RNA

<213> Artificial

45 <220>

<223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra FCN

<400> 3

gggagaacuu cgaccagaag uuugaaagaa acccaauua aaggaacagu augugcgcau 60

50 **acauggaucc uca 73**

<210> 4

<211> 73

<212> RNA

55 <213> Artificial

<220>

<223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra FCN

60 <400> 4

ES 2 567 270 T3

	gggagaacuu cgaccagaag uuugaaagaa acccaauua aagugaacag uaugugcgca	60
	uacuggaucc uca	73
5	<210> 5 <211> 61 <212> RNA <213> Artificial	
10	<220> <223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra FCN <400> 5	
	gggagaacuu cgaccagaag uuugaaagaa acccaauua aaaacaguau gugcgcauac	60
	a	61
15	<210> 6 <211> 62 <212> RNA <213> Artificial	
20	<220> <223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra FCN <400> 6	
	gggagaacuu cgaccagaag uuugaaagaa acccaaaaaa gugaacagua ugugcgcaua	60
25	ca	62
30	<210> 7 <211> 61 <212> RNA <213> Artificial	
35	<220> <223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra FCN <400> 7	
	gggagaacuu cgaccagaag uuugaaagaa acccaauua aaggaaguau gugcgcauac	60
	a	61
40	<210> 8 <211> 62 <212> RNA <213> Artificial	
45	<220> <223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra FCN <400> 8	
	gggagaacuu cgaccagaag uuugaaagaa acccaauua aagugaacag augugcgcau	60
50	ca	62
55	<210> 9 <211> 57 <212> RNA <213> Artificial	
	<220> <223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra FCN	

ES 2 567 270 T3

	<400> 9	
5	gggagaacuu cgaccagaag uuugaagaaa acccaauuaa aaaagaugug cgcauca	57
	<210> 10 <211> 58 <212> RNA <213> Artificial	
10	<220> <223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra FCN	
	<400> 10	
15	gggagaacuu cgccagaagu uugaagaaa cccaauuaa aaaguaugug cgcauaca	58
	<210> 11 <211> 57 <212> RNA <213> Artificial	
20	<220> <223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra FCN	
25	<400> 11	
	gggagaacuu cgccagaagu uugaagaaa cccaauuaa aaguaugugc gcauaca	57
30	<210> 12 <211> 57 <212> RNA <213> Artificial	
35	<220> <223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra FCN	
	<400> 12	
40	gggagaacuu cgccagaagu uugaagaaa cccaauuaa aaguaugugc gcauaca	57
	<210> 13 <211> 56 <212> RNA <213> Artificial	
45	<220> <223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra FCN	
50	<400> 13	
	gggagaacuu cgccagaagu uugaagaaa cccaauuaa aaguaugugcg cauaca	56
55	<210> 14 <211> 57 <212> RNA <213> Artificial	
60	<220> <223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra FCN	
	<400> 14	
65	gggagaacuu cgccagaagu uugaagaaa cccaauuaa aaguaugugc gcauaca	57
	<210> 15	

ES 2 567 270 T3

<211> 56
 <212> RNA
 <213> Artificial
 5 <220>
 <223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra FCN
 <400> 15
 10 gggagaacuu cgccagaagu uugaaagaaa cccauuaaaa aguaugugcg cauaca 56
 <210> 16
 <211> 56
 <212> RNA
 15 <213> Artificial
 <220>
 <223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra FCN
 20 <400> 16
 gggagaacuu cgccagaagu uugaaagaaa cccaaauuaa aaagaugugc gcauca 56
 <210> 17
 25 <211> 54
 <212> RNA
 <213> Artificial
 <220>
 30 <223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra FCN
 <400> 17
 gggagaacuu cgccagaagu uugaaagaaa cccaaauuaa agaugugcg auca 54
 35 <210> 18
 <211> 53
 <212> RNA
 <213> Artificial
 40 <220>
 <223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra FCN
 <400> 18
 45 gggagaacuu cgccagaagu uugaaagaaa cccaaauuaa gaugugcgca uca 53
 <210> 19
 <211> 52
 50 <212> RNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra FCN
 55 <400> 19
 gggagaacuu cgccagaagu uugaaagaaa cccaaauuaa gaugugcgca uc 52
 60 <210> 20
 <211> 51
 <212> RNA
 <213> Artificial
 65 <220>
 <223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra FCN

ES 2 567 270 T3

	<400> 20	
5	gggagaacuu cgccagaagu uugaaagaaa cccaaauaaa gugugcgac a	51
	<210> 21	
	<211> 51	
	<212> RNA	
	<213> Artificial	
10	<220>	
	<223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra FCN	
	<400> 21	
15	gggagaacuu cgccagaagu uugaaagaaa cccaaauaaa gagugcgcac a	51
	<210> 22	
	<211> 49	
20	<212> RNA	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra FCN	
25	<400> 22	
	gggagacucg ccagaguuga aagaaaccca aaauaagaug ugcgcauca	49
30	<210> 23	
	<211> 50	
	<212> RNA	
	<213> Artificial	
35	<220>	
	<223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra FCN	
	<400> 23	
40	gggagaacuu cgccagaagu uugaaagaaa cccaaauaag ugugcgaca	50
	<210> 24	
	<211> 49	
	<212> RNA	
45	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra FCN	
50	<400> 24	
	gggagaacuu cgccagaagu uugaaagaaa cccaaauaag ugugcgcac	49
	<210> 25	
55	<211> 47	
	<212> RNA	
	<213> Artificial	
	<220>	
60	<223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra FCN	
	<400> 25	
	gggagacucg ccagaguuga aagaaaccca aaauaagugu gcgaca	47
65	<210> 26	

<211> 45
 <212> RNA
 <213> Artificial

5 <220>
 <223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra FCN

<400> 26

10 gggagacucg ccagaguuga aagaaaccca aauaagugug cgcac 45

<210> 27
 <211> 46
 <212> RNA
 <213> Artificial

15 <220>
 <223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra FCN

20 <400> 27

gggagacucg cagaguugaa agaaacccaa auaagugug cgcaca 46

<210> 28
 <211> 44
 <212> RNA
 <213> Artificial

25 <220>

30 <223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra FCN

<400> 28

gggagacucg cagaguugaa agaaacccaa auaagugugc gcac 44

35 <210> 29
 <211> 44
 <212> RNA
 <213> Artificial

40 <220>

45 <223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra FCN

<400> 29

gggagacucg ccagaguuga aagaaaccca aauagugugc gcac 44

<210> 30
 <211> 43
 <212> RNA
 <213> Artificial

50 <220>

55 <223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra FCN

<400> 30

gggagacucg cagaguugaa agaaacccaa auagugugc cac 43

60 <210> 31
 <211> 69
 <212> RNA
 <213> Artificial

65 <220>
 <223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra FCN

ES 2 567 270 T3

	<400> 31	
	gggagaacuu cgaccagaag ucgauaacga acaaaacucc caaaggaaua uaugugcgca	60
5	uacauggau	69
	<210> 32	
	<211> 64	
	<212> RNA	
10	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra FCN	
	<400> 32	
15	gggagaacuu cgaccagaag ucgauaacga acaaaacucc caaaggaaua uaugugcgca	60
	uaca	64
	<210> 33	
	<211> 72	
20	<212> RNA	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra FCN	
25	<400> 33	
	gggagaacuu cgaccagaag ucgauaacga acaaaacucc caaaggaaua uaugugcgca	60
	uacauggauc cu	72
30	<210> 34	
	<211> 62	
	<212> RNA	
	<213> Artificial	
35	<220>	
	<223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra FCN	
	<400> 34	
	gggagaacuu cgaccagaag ucgauaacga acaaaacucc caaaggaaua ugugcgcaua	60
40	ca	62
	<210> 35	
	<211> 62	
	<212> RNA	
45	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra FCN	
50	<400> 35	
	gggagaacuu cgaccagaag ucgauaacga acaaaacucc caaagguaua ugugcgcaua	60
	ca	62
	<210> 36	
55	<211> 62	
	<212> RNA	
	<213> Artificial	

ES 2 567 270 T3

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

5 <400> 36
 ggggagaacuu cgaccagaag ucgauaacga acaaaacucc caaaaauaua ugugcgcaua 60
 ca 62

<210> 37
 <211> 61
 <212> RNA
 <213> Artificial

15 <220>
 <223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra FCN

<400> 37
 ggggagaacuu cgaccagaag ucgauaacga acaaaacucc cggaauauau gugcgcauac 60
 a 61

20 <210> 38
 <211> 63
 <212> RNA
 <213> Artificial

25 <220>
 <223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra FCN

<400> 38
 30 ggggagaacuu cgaccagaag ucgauaacga acaaaacucc caaaggaaua uaugugcgca 60
 uac 63

<210> 39
 <211> 61
 35 <212> RNA
 <213> Artificial

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

40 <400> 39
 ggggagaacuu cgaccagaag ucgauaacga acaaaacucc caaaggaaua gugcgcauac 60
 a 61

45 <210> 40
 <211> 60
 <212> RNA
 <213> Artificial

50 <220>
 <223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra FCN

<400> 40

55 ggggagaacuu cgaccagaag ucgauaacga acaaaacucc caauauaug ugcgcauaca 60
 <210> 41
 <211> 61
 <212> RNA

ES 2 567 270 T3

<213> Artificial

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

5 <400> 41

gggagaacuu cgaccagaag ucgauaacga acaaaacucc caaagguaau gugcgcauac 60

a 61

10 <210> 42
<211> 60
<212> RNA
<213> Artificial

15 <220>
<223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra FCN

<400> 42

20 gggagaacuu cgaccagaag ucgauaacga acaaaacucc cggaauaaug ugcgcauaca 60

<210> 43
<211> 58
<212> RNA

25 <213> Artificial

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

30 <400> 43

gggagaacuu cgaccagaag ucgauaacga acaaaacucc caaauaugug cgcauaca 58

<210> 44
<211> 59
<212> RNA
<213> Artificial

35 <220>
<223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra FCN

40 <400> 44

45 gggagaacuu cgaccagaag ucgauaacga acaaaacucc caaaggaugu gcgcauaca 59

<210> 45
<211> 59
<212> RNA
<213> Artificial

50 <220>
<223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra FCN

<400> 45

55 gggagaacuu cgaccagaag ucgauaacga acaaaacucc caaauaaugu gcgcauaca 59

<210> 46
<211> 57
<212> RNA
<213> Artificial

60 <220>
<223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra FCN

ES 2 567 270 T3

	<400> 46	
5	gggagaacuu cgaccagaag ucgauaacga acaaaacucc caaauaugug cgcauac	57
	<210> 47	
	<211> 57	
	<212> RNA	
	<213> Artificial	
10	<220>	
	<223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra FCN	
	<400> 47	
15	gggagaacuu cgaccagagu cgauaacgaa caaaacuccc aaauaugugc gcuaaca	57
	<210> 48	
	<211> 56	
20	<212> RNA	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra FCN	
25	<400> 48	
	gggagaacuu cgaccagagu cgauaacgaa caaaacuccc aaauaugugc gcuaac	56
30	<210> 49	
	<211> 57	
	<212> RNA	
	<213> Artificial	
35	<220>	
	<223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra FCN	
	<400> 49	
40	gggagaacuu cgaccagaag ucgauaacga acaaaacucc caauaugugc gcuaaca	57
	<210> 50	
	<211> 55	
	<212> RNA	
45	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra FCN	
50	<400> 50	
	gggagaacuu cgaccagagu cgauaacgaa caaaacuccc aaauaugugcg cauac	55
	<210> 51	
55	<211> 54	
	<212> RNA	
	<213> Artificial	
	<220>	
60	<223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra FCN	
	<400> 51	
	ggagaacuuc gaccagaguc gauaacgaac aaaacuccaa auaugugcg auac	54
65	<210> 52	

<211> 57
 <212> RNA
 <213> Artificial

5 <220>
 <223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra FCN

<400> 52

10 gggagaacuu cgaccagaag uuugaaaaa acccaauua aaguaugugc gcauaca 57

<210> 53
 <211> 56
 <212> RNA
 <213> Artificial

15 <220>
 <223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra FCN

20 <400> 53

gggagaacuu cgaccagagu cgagagcgaa agaaacuccc aaauaugugc gcauac 56

<210> 54
 <211> 58
 <212> RNA
 <213> Artificial

25 <220>

30 <223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra FCN

<400> 54

35 gggagaacuu cgaccagaag auuugaaaaa aacccaauu aaaguaugug cgcauaca 58

<210> 55
 <211> 41
 <212> RNA
 <213> Artificial

40 <220>

45 <223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra FCN

<400> 55

gggauaaaaa uagaguuuuga uaaacaccug uauuaaaacc c 41

<210> 56
 <211> 41
 <212> DNA
 <213> Artificial

50 <220>

55 <223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra FCN

<400> 56

gggauaaaaa uagaguuuuga taaacaccug uauuaaaacc c 41

60 <210> 57
 <211> 41
 <212> DNA
 <213> Artificial

65 <220>
 <223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra FCN

<400> 57

5 gggauaaaaa uagagtuuga taaacaccug uauuaaaacc c 41

<210> 58
<211> 41
<212> DNA
<213> Artificial

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

<400> 58

15 gggauaaaaa uagaguuuga taaacaccug uautaaaacc c 41

<210> 59
<211> 41
<212> DNA
<213> Artificial

20 <220>
<223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra FCN

25 <400> 59

gggauaaaaa uagaguuuga taaacaccug uauuaaaacc c 41

30 <210> 60
<211> 41
<212> DNA
<213> Artificial

35 <220>
<223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra FCN

<400> 60

40 gggauaaaaa uagagtuuga tauacaccug uauuaaaacc c 41

<210> 61
<211> 41
<212> DNA
<213> Artificial

45 <220>
<223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra FCN

50 <400> 61

gggauaaaaa uagagtuuga taaacaccug uauuaaaacc c 41

55 <210> 62
<211> 41
<212> DNA
<213> Artificial

60 <220>
<223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra FCN

<400> 62

65 gggauaaaaa uagagtuuga taaacaccug uauuaaaacc c 41

<210> 63

<211> 41
 <212> DNA
 <213> Artificial

5 <220>
 <223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra FCN
 <400> 63

10 gggauaaaaa uagagtuuga taaacaccug uauuaaaacc c 41
 <210> 64
 <211> 11
 <212> RNA
 15 <213> Artificial
 <220>
 <223> secuencia consenso

20 <400> 64
 ugaaraaac c 11
 <210> 65
 25 <211> 11
 <212> RNA
 <213> Artificial
 <220>
 30 <223> secuencia consenso
 <400> 65
 cgaamraaac u 11
 35 <210> 66
 <211> 11
 <212> RNA
 <213> Artificial
 40 <220>
 <223> secuencia consenso
 <400> 66
 45 ugaaaaaaac c 11
 <210> 67
 <211> 11
 50 <212> RNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> secuencia consenso
 55 <400> 67
 ugaagaaac c 11
 60 <210> 68
 <211> 11
 <212> RNA
 <213> Artificial
 65 <220>
 <223> secuencia consenso

ES 2 567 270 T3

<400> 68

5 cgaacaaaac u 11

<210> 69

<211> 11

<212> RNA

<213> Artificial

10

<220>

<223> secuencia consenso

15

<400> 69

cgaaagaaac u 11

REIVINDICACIONES

1. Un aptámero que se une a FCN, que satisface los siguientes (1) y (2):
 - (1) que comprende una cualquiera de las secuencias de nucleótidos (a), (b) y (c) a continuación:
 - (a) una secuencia de nucleótidos seleccionada entre SEQ ID NOs: 1 - 54 (en donde uracilo puede ser timina);
 - 5 (b) una secuencia de nucleótidos seleccionada entre SEQ ID NOs: 1 - 54 (en donde uracilo puede ser timina), en la que 1 a 4 nucleótidos están sustituidos, delecionados, insertados o añadidos; y
 - (c) una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad del 90% o superior con una secuencia de nucleótidos seleccionada entre SEQ ID NOs: 1 - 54 (en donde uracilo puede ser timina), y
 - (2) que tiene una longitud de bases que no es superior a 73.
- 10 2. El aptámero según la reivindicación 1, que inhibe la unión entre FCN y un receptor de FCN.
3. El aptámero según la reivindicación 1 o 2, que inhibe la actividad de crecimiento de neuritas o la actividad de proliferación celular de FCN.
4. El aptámero según la reivindicación 3, que tiene una concentración inhibitoria del 50% que no es superior a 10 nM.
- 15 5. El aptámero según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que no se une a NT-3.
6. El aptámero según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que no inhibe la actividad de proliferación celular de BDNF, NT-3 o NT-4/5.
7. El aptámero según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que al menos un nucleótido está modificado.
- 20 8. El aptámero según la reivindicación 7, que está modificado con dT invertida o polietilenglicol.
9. El aptámero según una cualquiera de las reivindicaciones 7 u 8, en el que los grupos hidroxilo en la posición 2' de una ribosa de los nucleótidos de pirimidina respectivos son iguales o diferentes y no están reemplazados o están reemplazados por un átomo o un grupo seleccionado a partir del grupo que consiste en un átomo de hidrógeno, un átomo de flúor y un grupo metoxi.
- 25 10. El aptámero según una cualquiera de las reivindicaciones 7 u 8, en el que los grupos hidroxilo en la posición 2' de una ribosa de los nucleótidos de purina respectivos son iguales o diferentes y no están reemplazados o están reemplazados por un átomo o un grupo seleccionado a partir del grupo que consiste en un átomo de hidrógeno, un átomo de flúor y un grupo metoxi.
- 30 11. Un complejo que comprende el aptámero según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 y una sustancia funcional.
12. Una composición farmacéutica que comprende el aptámero según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 o el complejo según la reivindicación 11.
13. Un agente contra el dolor que comprende el aptámero según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 o el complejo según la reivindicación 11.
- 35 14. El aptámero según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 o el complejo según la reivindicación 11, para la profilaxis o el tratamiento de una enfermedad que está acompañada de dolor o inflamación.

FIG. 1

