

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 602 119**

51 Int. Cl.:

<b>C12N 15/09</b>	(2006.01)	<b>G01N 33/53</b>	(2006.01)
<b>A61K 9/107</b>	(2006.01)	<b>C12N 15/115</b>	(2010.01)
<b>A61K 31/7105</b>	(2006.01)		
<b>A61K 48/00</b>	(2006.01)		
<b>A61K 49/00</b>	(2006.01)		
<b>A61P 29/00</b>	(2006.01)		
<b>A61P 35/00</b>	(2006.01)		
<b>A61P 37/02</b>	(2006.01)		
<b>A61P 37/08</b>	(2006.01)		
<b>C12Q 1/68</b>	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.07.2009 PCT/JP2009/062764**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **21.01.2010 WO10008001**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.07.2009 E 09797926 (4)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.08.2016 EP 2316935**

54 Título: **Aptámero contra IL-17 y uso del mismo**

30 Prioridad:

**14.07.2008 JP 2008183233**

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

**17.02.2017**

73 Titular/es:

**THE UNIVERSITY OF TOKYO (100.0%)  
3-1, Hongo 7-chome  
Bunkyo-Ku, Tokyo 113-8654, JP**

72 Inventor/es:

**NAKAMURA, YOSHIKAZU;  
OHUCHI, SHOJI y  
ISHIGURO, AKIRA**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

ES 2 602 119 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 contra IL-17 y uso del mismo

**Campo técnico**

5 La presente descripción se refiere a un aptámero contra IL-17, se define un método de utilización del mismo en las reivindicaciones.

**Técnica Anterior**

10 La interleucina 17 (IL-17 o CTLA-8), una citoquina secretada por células Th17, está profundamente asociada con enfermedades inflamatorias, enfermedades autoinmunes, y enfermedades infecciosas. La IL-17 humana es una glicoproteína de 20-30 kDa configurada con 155 aminoácidos, que comprende un péptido señal en el extremo N-terminal. En la estructura molecular de la misma están presentes seis restos de cisteína y un sitio de unión a una cadena de azúcar unida a N. La forma madura consiste en 136 aminoácidos, que existe normalmente como un dímero.

15 Se conocen seis clases de proteínas como proteínas de la familia de IL-17: IL-17A, B, C, D, E y F. Normalmente, IL-17 se refiere a IL-17A. La IL-17E también se llama IL-25. La homología de secuencia de aminoácidos de IL-17 humana con IL-17B, C, D, E y F humanas es de 25, 28, 22, 27 y 44%, respectivamente, siendo IL-17F la de homología más alta. IL-17 humana tiene homologías de 63% y 90% con IL-17 de ratón y con IL-17 de mono tífi. Como receptores de la misma se conocen IL-17RA, IL-17RB, IL-17RC, IL-17RD e IL-17RE. IL-17 e IL-17F forman un homodímero o heterodímero y se unen a IL-17RA e IL-17RC. La unión de IL-17 e IL-17RA es débil con un valor de Kd de aproximadamente  $10^{-7}$ , lo que sugiere que la participación de IL-17RC puede ser importante.

20 Las células Th17 son células T CD4<sup>+</sup> que producen IL-17. Cuando las células T CD4<sup>+</sup> de memoria se estimulan con IL-23 in vitro, se induce la producción de IL-17. Mientras tanto, el TGF- $\beta$  y la IL-6 desempeñan una función importante en la inducción de la diferenciación de las células Th17. El TGF- $\beta$  y la IL-6 actúan sobre las células T vírgenes para inducir la expresión de ROR $\gamma$ t (factor transcripcional). Ya que la deficiencia de ROR $\gamma$ t hace a las células Th17 incapaces de diferenciarse, y ya que también las células T vírgenes por el contrario se pueden diferenciar a células productoras de IL-17 por expresión forzada de ROR $\gamma$ t, se cree que este factor transcripcional es importante para la diferenciación de las células Th17. Aunque es importante la activación de STAT3 por la IL-6 para la inducción de ROR $\gamma$ t, por el contrario, la activación de STAT5 por la IL-2 suprime la expresión. La IL-2 es necesaria para la diferenciación de las células T reguladoras; los ratones deficientes en IL-2 experimentan una autoinmunidad grave; esto se piensa que es debido a una disminución de las células T reguladoras y, al mismo tiempo, a una sobre-diferenciación de las células Th17. Cuando las células T vírgenes se estimulan in vitro solamente con TGF- $\beta$ , no se inducen las células Th17 sino las células T reguladoras.

35 Cuando IL-17 se une al receptor, se activan la vía NF- $\kappa$ B, la vía MAP quinasa y la vía C/EBP a través de Act-1 y TRAF6, dando como resultado la inducción de citoquinas y quimioquinas inflamatorias. Por ejemplo, IL-17 actúa sobre los macrófagos para inducir la expresión de IL-1, TNF, MMP-9 y similares. Además, se sabe que IL-17 actúa también sobre células sistémicas de tejido conectivo como fibroblastos y células endoteliales, y sobre células del sistema inmune como células progenitoras de células dendríticas, para inducir la expresión de varias citoquinas y receptores como IL-6, IL-1, e ICAM-1.

Citoquinas implicadas en la producción de IL-17 están citoquinas como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IFN- $\gamma$ . Mientras tanto, la producción de estas citoquinas se induce por IL-17. Se sabe que IL-17 actúa sinérgicamente con otras citoquinas.

40 Se ha encontrado que IL-17 está profundamente asociada con enfermedades inflamatorias, enfermedades autoinmunes y similares. Se sabe que la expresión de IL-17 está elevada en pacientes con artritis reumatoide crónica, lupus eritematoso sistémico, enfermedad de Behçet, rechazo del injerto, síndrome nefrítico, enfermedad inflamatoria intestinal, asma, esclerosis múltiple, enfermedad periodontal y similares. Se ha referido que en ratones deficientes en IL-17 está notablemente suprimida la artritis inducida por colágeno (CIA), que es un modelo de artritis reumatoide crónica; la encefalomielite autoinmune experimental (EAE), que es un modelo de esclerosis múltiple; las reacciones de hipersensibilidad de contacto por DNFB o TNFB; las reacciones de hipersensibilidad retardada de contacto por BSA metilada; las reacciones de hipersensibilidad de vía aérea por inducción de OVA, y similares.

50 La IL-17 también está asociada con cánceres. Se ha referido que el trasplante subcutáneo de células de cáncer de pulmón no microcítico en ratones SCID promueve la proliferación de células cancerosas en ratones que tienen una expresión elevada de IL-17 en ellos. También se ha referido que IL-17 está también asociada con el cáncer cervical uterino y el cáncer ovárico.

55 La IL-17 se asocia con las enfermedades infecciosas. Los ratones knockout (con el gen eliminado) de IL-17R son altamente susceptibles a la infección por *Klebsiella pneumoniae*, a la infección por *Candida albicans*, a la infección por *Toxoplasma gondii* y similares. La producción de IL-17 se induce por polisacáridos (LPS) y componentes del cuerpo celular bacteriano como de *Borrelia burgdorferi* y *Klebsiella pneumoniae*. Se cree que estos componentes promueven la producción de IL-17 que actúa sobre células presentadoras de antígeno para inducir IL-23. En

ratones knockout IL-17R, después de la infección por *Klebsiella pneumoniae*, se ha reducido la producción de CXCL1, CXCL2, G-CSF y similares en sitios infectados en el pulmón, las cuales desempeñan una función importante en la migración y funciones de los neutrófilos, con una observada perturbación en la migración de neutrófilos.

- 5 En los últimos años, han llamado la atención las aplicaciones de los aptámeros de RNA a medicamentos, reactivos de diagnóstico, y reactivos de ensayo; algunos aptámeros de RNA ya han estado en fase de estudio clínico o en uso práctico. En diciembre del 2004, el primer medicamento de aptámero de RNA en el mundo, Macugen, se aprobó como un medicamento terapéutico para la degeneración macular relacionada con la edad en los EE.UU. Un aptámero de RNA se refiere a un RNA que se une específicamente a una molécula diana como una proteína, y se puede preparar usando el método SELEX (Evolución Sistemática de Ligandos por Enriquecimiento Sistemático) (Publicación de Patente Internacional WO91/19813, WO94/08050, WO95/07364). En el método SELEX, se selecciona un RNA que se une específicamente a una molécula diana de un grupo de RNA con secuencias de nucleótidos diferentes de aproximadamente  $10^{14}$ . El RNA usado tiene una secuencia aleatoria de aproximadamente 40 restos, que está flanqueado por secuencias iniciadoras. Se deja que se mezcle este grupo de RNA con una molécula diana, y solamente se recoge el RNA que se ha unido a la molécula diana usando un filtro y similares. El RNA recogido se amplifica por RT-PCR, y éste se usa como molde para la siguiente ronda. Se puede obtener un aptámero de RNA que se une específicamente a una molécula diana mediante la repetición de esta operación aproximadamente 10 veces.

Documentos de la Técnica anterior

- 20 Zhou et al. 2007 (CYTOKINE, vol. 38, no. 3, páginas 157-164) se refiere a las vías de transducción de señal intracelular inducidas por IL-17A frente a IL-17F y la modulación por la interferencia de RNA de IL-17RA e IL-17RC en células de adenocarcinoma gástrico AGS.

Documentos de Patente

Documento de la patente 1: WO91/19813

- 25 Documento de la patente 2: WO94/08050

Documento de la patente 3: WO95/07364

EP 1 938 802 A1 se refiere a RNAs que interfieren dirigidos a citoquinas pro-inflamatorias.

WO 2006/088925 se refiere a las interacciones de IL-17F e IL-17R.

### Compendio de la Invención

- 30 Problemas a resolver por la Invención

La presente invención está definida en las reivindicaciones. Se dirige a proporcionar un aptámero para IL-17A y un método para utilizar el mismo.

Medios de resolver los problemas

- 35 Los presentes inventores investigaron esmeradamente para resolver el problema descrito anteriormente y tuvieron éxito en preparar un aptámero de buena calidad para IL-17A, que culminó en la presente invención.

Por consiguiente, la presente invención proporciona lo siguiente:

1. un aptámero que se une a IL-17A y/o inhibe la unión de IL-17A al receptor de IL-17, en donde:
  - a. el aptámero comprende una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID n.º: 58, la SEQ ID NO: 59 o la SEQ ID NO: 60;
  - 40 b. el aptámero comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada de entre las SEQ ID NO: 3 a 5, 22 a 28, 32 a 36, 45 a 48, 50 y 51 (con la condición de que el uracilo puede ser timina); o
  - c. el aptámero comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada de entre las SEQ ID NO: 3 a 5, 22 a 28, 32 a 36, 45 a 48, 50 y 51 (con la condición de que el uracilo puede ser timina) en donde están sustituidos, suprimidos, insertados o añadidos, de uno a cinco nucleótidos.
  - 45 y cada grupo hidroxilo en la posición 2' de la ribosa de los nucleótidos contenido en el aptámero (a) – (c) anterior está independientemente sin sustituir o sustituido por un átomo o grupo seleccionado del grupo que consiste en un átomo de hidrógeno, un grupo metoxi o un átomo de flúor;
2. un aptámero según 1, en donde el aptámero no inhibe la unión de IL-17F y el receptor de IL-17;

3. el aptámero descrito en 1, en donde el nucleótido de pirimidina es un nucleótido modificado;
4. el aptámero de 1, en donde:
  - a. el aptámero comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada de entre las SEQ ID NO: 1, 2, 6 a 21, 29 a 31, 37 a 44, 49 y 52 a 54 (con la condición de que el uracilo puede ser timina), en donde los nucleótidos contenidos en el aptámero son tales que,
    - i. cada posición 2' de la ribosa del nucleótido de pirimidina es la misma o diferente y hay un átomo de flúor o sustituido por un átomo o grupo seleccionado del grupo que consiste en átomo de hidrógeno, grupo hidroxilo y grupo metoxi, y
    - ii. cada posición 2' de la ribosa del nucleótido de pirimidina es la misma o diferente y hay un grupo hidroxilo o sustituido por un átomo o grupo seleccionado del grupo que consiste en átomo de hidrógeno, grupo metoxi y átomo de flúor; o
  - b. el aptámero comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada de entre las SEQ ID NO: 1, 2, 6 a 21, 29 a 31, 37 a 44, 49 y 52 a 54 (con la condición de que el uracilo puede ser timina), en donde están sustituidos, suprimidos, insertados o añadidos de uno a cinco nucleótidos, en donde los nucleótidos contenidos en el aptámero son tales que,
    - i. cada posición 2' de la ribosa del nucleótido de pirimidina es la misma o diferente y hay un átomo de flúor o sustituido por un átomo o grupo seleccionado del grupo que consiste en átomo de hidrógeno, grupo hidroxilo y grupo metoxi, y
    - ii. cada posición 2' de la ribosa del nucleótido de pirimidina es la misma o diferente y hay un grupo hidroxilo o sustituido por un átomo o grupo seleccionado del grupo que consiste en átomo de hidrógeno, grupo metoxi y átomo de flúor;
5. el aptámero descrito en 4, que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 40 o 44;
6. el aptámero de cualquiera de 1 a 5, en donde un nucleótido contenido en el aptámero está modificado;
7. un complejo que comprende un aptámero de cualquiera de 1 a 6 y una sustancia funcional;
8. el complejo según 7, en donde la sustancia funcional es una sustancia de afinidad, una sustancia para marcaje, una enzima, un vehículo de administración de fármacos o un medicamento;
9. un fármaco que comprende un aptámero de cualquiera de 1 a 6 o el complejo descrito en 7 u 8;
10. un fármaco para su uso en un método de tratamiento o prevención de una enfermedad autoinmune, cáncer, alergia u otra enfermedad asociada con la inflamación, que comprende el aptámero descrito en cualquiera de 1 a 6 o el complejo descrito en 7 u 8;
11. un reactivo de diagnóstico que comprende un aptámero de cualquiera de 1 a 6, o el complejo descrito en 7 u 8;
12. una sonda de detección de IL-17A que comprende un aptámero de cualquiera de 1 a 6, o el complejo descrito en 7 u 8;
13. un portador de fase sólida para la purificación de IL-17A que comprende un aptámero de cualquiera de 1 a 6, o el complejo descrito en 7 u 8;
14. un método de detección o purificación de IL-17A, que comprende el uso de un aptámero de cualquiera de 1 a 6, o el complejo descrito en 7 u 8.

#### Efecto de la Invención

- 40 El aptámero o el complejo de la presente invención puede ser útil como fármaco o reactivo como un reactivo de diagnóstico para enfermedades inflamatorias, y enfermedades como cáncer, alergia y enfermedad infecciosa. El aptámero o el complejo de la presente invención puede ser también útil en la purificación y concentración de IL-17A, marcaje de IL-17A, y la detección y cuantificación de IL-17A.

#### Breve descripción de los dibujos

- 45 La Fig. 1 muestra la estructura secundaria del aptámero mostrado en la SEQ ID NO: 1 predicha por el programa MFOLD, en donde la parte encerrada en un círculo negro muestra una secuencia común.  
La Fig. 2 muestra la estructura secundaria del aptámero mostrado en la SEQ ID NO: 2 predicha por el programa MFOLD, en donde la parte encerrada en un círculo negro muestra una secuencia común.

La Fig. 3 muestra la estructura secundaria del aptámero mostrado en la SEQ ID NO: 29 predicha por el programa MFOLD, en donde la parte encerrada en un círculo negro muestra una secuencia común.

La Fig. 4 muestra la estructura secundaria del aptámero mostrado en la SEQ ID NO: 7 predicha por el programa MFOLD, en donde la parte encerrada en un cuadrado y un \* (asterisco) muestra una secuencia común.

- 5 La Fig. 5 muestra la estructura secundaria del aptámero mostrado en la SEQ ID NO: 13 predicha por el programa MFOLD, en donde la parte encerrada en un cuadrado y un \* (asterisco) muestra una secuencia común.

La Fig. 6 muestra la estructura secundaria del aptámero mostrado en la SEQ ID NO: 30 predicha por el programa MFOLD, en donde la parte encerrada en un cuadrado y un \* (asterisco) muestra una secuencia común.

La Fig. 7 es un sensograma que muestra que el aptámero mostrado en la SEQ ID NO: 1 se une a IL-17 humana.

- 10 La Fig. 8 es un sensograma que muestra que el aptámero mostrado en la SEQ ID NO: 1 no se une a IL-17F humana.

La Fig. 9 muestra la estructura secundaria del aptámero mostrado en la SEQ ID NO: 40 predicha por el programa MFOLD, en donde la parte encerrada en un círculo negro muestra una secuencia común.

- 15 La Fig. 10 muestra la estructura secundaria del aptámero mostrado en la SEQ ID NO: 44 predicha por el programa MFOLD, en donde la parte encerrada en un cuadrado y un \* (asterisco) muestra una secuencia común.

La Fig. 11 es un sensograma que muestra que el aptámero mostrado en la SEQ ID NO: 1 (Apt1) inhibe la unión a IL-17 humana y al IL-17R.

- 20 La Fig. 12 muestra que el aptámero mostrado en la SEQ ID NO: 44 posee actividad inhibidora frente a la señalización de IL-17. Los círculos negros muestran los resultados para un DNA control, los triángulos negros muestran los resultados para un anticuerpo neutralizante anti-IL-17, y los cuadrados negros muestran los resultados para un aptámero, respectivamente.

- 25 La Fig. 13 muestra los resultados de un experimento de supresión de la patogénesis por un aptámero en un modelo de ratón de EAE. Los círculos negros muestran los resultados de un grupo control, los cuadrados negros muestran los resultados de un grupo que recibe el aptámero a 1 mg/kg, los triángulos negros muestran los resultados de un grupo que recibe el aptámero a 3 mg/kg, y Xs muestra los resultados de un grupo que recibe el aptámero a 10 mg/kg, respectivamente. Cada \* (asterisco) indica  $P < 0,05$ , y cada \*\* indica  $P < 0,01$ .

### Realizaciones de la Invención

La presente invención proporciona un aptámero que posee una actividad de unión para IL-17. Los aptámeros de la presente invención son capaces de inhibir las actividades de IL-17. La IL-17 se llama algunas veces IL-17A.

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

- 35 La actividad inhibidora frente a IL-17 significa el potencial de inhibición de una actividad opcionalmente elegida que posee IL-17. Por ejemplo, IL-17 actúa sobre las células del sistema inmune, las células del sistema de tejido conectivo y similares para inducir la producción de varias citoquinas y quimioquinas. Por lo tanto, la actividad inhibidora frente a IL-17 se refiere a una actividad que inhibe la producción de estas citoquinas, quimioquinas y similares. Dado que la expresión de estas citoquinas y quimioquinas induce la migración y activación de las células inflamatorias, la actividad inhibidora frente a IL-17 significa la inhibición de las actividades de las mismas.

- 40 La IL-17 se refiere a citoquina producida por células Th17, que son células T CD4<sup>+</sup>, y es por ejemplo, una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos mostrado por el código de acceso AAH67505 o NP002181. La IL-17 se llama algunas veces IL-17A o CTLA-8. Además de ser producida en cuerpos de animales, IL-17 se puede preparar usando células de ratón u otras de mamífero, células de insecto, células de Escherichia coli y similares, y también se puede preparar por síntesis química. Cuando se prepara IL-17 a partir de cultivo celular o por síntesis química, se puede preparar fácilmente un mutante. Aquí, un mutante significa una secuencia en donde se han sustituido varios aminoácidos o una secuencia de aminoácidos parcial, y quiere decir una proteína o un péptido que tiene al menos una de las actividades esenciales poseídas por IL-17. Cuando se sustituye un aminoácido, el aminoácido sustituyente puede ser un aminoácido natural, o puede ser un aminoácido no natural. Como se menciona en la presente descripción, IL-17 incluye estos mutantes.

- 50 Un receptor de IL-17 significa una proteína de la superficie celular a la cual se une IL-17. Como miembros de la familia de receptores de IL-17, se conocen IL-17RA, IL-17RB, IL-17RC, IL-17RD e IL-17RE. Como se ha mencionado, el receptor de IL-17 puede ser una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos naturales, o puede ser un mutante de la misma. Aquí, un mutante significa una secuencia en donde se han sustituido varios

aminoácidos o una secuencia de aminoácidos parcial, y significa una proteína o un péptido que posee actividad de unión para IL-17. La presente invención proporciona un aptámero como se define en las reivindicaciones que inhibe la unión de IL-17 y el receptor de IL-17.

5 El aptámero de la presente invención puede presentar actividad inhibitoria frente a IL-17 derivada de cualquier mamífero. Tales mamíferos incluyen primates (p. ej. humanos, monos), roedores (p. ej. ratones, ratas y cobayas), y animales de compañía, animales domésticos y animales de trabajo (p. ej. perros, gatos, caballos, bovinos, cabra, oveja, cerdos).

10 Se describe un aptámero que no está particularmente limitado, en la medida en que es capaz de unirse a una porción opcional elegida de IL-17 para inhibir la actividad de la misma. El aptámero de la invención es preferiblemente un aptámero que inhibe la unión de IL-17 y el receptor de IL-17, que comprende la secuencia ggauagcgaagucgagcgc (SEQ ID NO: 40). Esta secuencia incluye una secuencia que es común con las secuencias de nucleótidos mostradas en las SEQ ID NO: 1, 2 y 29 descritas abajo (SEQ ID NO: 58), y que tiene la misma estructura secundaria como se predice usando el programa MFOLD (advértase en Fig. 9).

15 Aunque el aptámero de la presente invención no está particularmente limitado, en la medida en que es capaz de unirse a una porción opcionalmente elegida de IL-17 para inhibir la actividad de la misma, es preferible un aptámero que inhibe la unión de IL-17 y el receptor de IL-17, y que comprende la secuencia ggucucagcggaggagucagaaucgguagacc (SEQ ID NO: 44). Esta secuencia incluye una secuencia que es común a las secuencias de nucleótidos mostradas en las SEQ ID NO: 6-21, 30 y 31 descritos abajo (SEQ ID NO: 59) (o una secuencia que es común a las secuencias de nucleótidos mostradas en las SEQ ID NO: 7, 9, 13, 21 y 30 descritas abajo (SEQ ID NO: 60)), y que tiene la misma estructura secundaria como se predice usando el programa MFOLD (advértase en Fig. 10).

20 Aunque el aptámero de la presente invención no está particularmente limitado, en la medida en que es capaz de unirse a una porción elegida opcionalmente de IL-17 para inhibir la actividad de la misma, es preferible un aptámero que inhibe la unión de IL-17 y el receptor de IL-17 que contiene la secuencia gauagcgaagucgagcgc (SEQ ID NO: 58). Esta secuencia es una secuencia que es común a las secuencias de nucleótidos mostradas en las SEQ ID NO: 1, 2 y 29 descritas abajo, y que tiene la misma estructura secundaria como se predijo usando el programa MFOLD (advértase en Figs. 1-3).

25 Aunque el aptámero de la presente invención no está particularmente limitado, en la medida en que es capaz de unirse a una porción elegida opcionalmente de IL-17 para inhibir la actividad de la misma, es preferible un aptámero que inhibe la unión de IL-17 y el receptor de IL-17 que contiene la secuencia ggagucag (SEQ ID NO: 59). Esta secuencia es una secuencia que es común a las secuencias de nucleótidos mostradas en las SEQ ID NO: 6-21, 30 y 31 descritas abajo, y que tiene la misma estructura secundaria como se predijo usando el programa MFOLD (advértase en Figs. 4-6).

30 El aptámero de la presente invención es preferiblemente un aptámero que inhibe la unión de IL-17 y el receptor de IL-17, y que comprende la secuencia ggaggagucagaauc (SEQ ID NO: 60). Esta secuencia es una secuencia que es común a las secuencias de nucleótidos mostradas en las SEQ ID NO: 7, 9, 13, 21 y 30 descritas abajo, y que tiene la misma estructura secundaria como se predijo usando el programa MFOLD (advértase en Figs. 4-6).

35 La longitud del aptámero de la presente invención no está limitada, y generalmente puede ser de aproximadamente 10 a aproximadamente 200 nucleótidos, y puede ser, por ejemplo, no más de aproximadamente 100 nucleótidos, preferiblemente no más de aproximadamente 50 nucleótidos, más preferiblemente no más de aproximadamente 40 nucleótidos, más preferiblemente no más de aproximadamente 35 nucleótidos. Cuando el número total de nucleótidos es más pequeño, será más fácil la síntesis química y la producción en masa, y hay una mayor ventaja en términos de coste. También se cree que es fácil la modificación química, la estabilidad en el cuerpo es alta, y la toxicidad es baja.

40 Cada nucleótido contenido en el aptámero de la presente invención es el mismo o diferente y puede ser un nucleótido que comprende un grupo hidroxilo en la posición 2' de la ribosa (p. ej., ribosa del nucleótido de pirimidina, ribosa del nucleótido de purina) (es decir, un nucleótido no sustituido) o un nucleótido sustituido (modificado) por un átomo o grupo en la posición 2' de la ribosa (algunas veces se describe en la presente invención como "nucleótido sustituido" o "nucleótido modificado").

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

50 En el aptámero de la presente invención, todos los nucleótidos de pirimidina son los mismos 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 grupo seleccionado del grupo que consiste en un átomo de hidrógeno, un grupo hidroxilo y un grupo metoxi, en la posición 2' de la ribosa.

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

10 El aptámero de la presente invención también puede ser uno en donde todos los nucleótidos comprenden idénticamente 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.

15 El aptámero de la presente invención también puede poseer la característica de ser capaz de inhibir la actividad de IL-17, pero no ser capaz de inhibir la actividad de IL-17F. El aptámero de la presente invención también puede poseer la característica de ser capaz de inhibir la unión de IL-17 y el receptor de IL-17, pero no ser capaz de inhibir la unión de IL-17F y el receptor de IL-17. La IL-17F es una proteína de la familia de IL-17 que tiene una homología de un 44%, siendo la más similar a IL-17.

El aptámero de la presente invención también puede ser:

- 20 a. un aptámero que comprende una secuencia de nucleótidos de las SEQ ID NO: 58, 59, 60, 3 a 5, 22 a 28, 32 a 36, 45 a 48, 50 o 51 (con la condición de que el uracilo puede ser timina);
- b. un aptámero que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada de entre las SEQ ID NO: 3 a 5, 22 a 28, 32 a 36, 45 a 48, 50 y 51 (con la condición de que el uracilo puede ser timina), en donde están sustituidos, suprimidos, insertados o añadidos de uno a cinco nucleótidos. Se describe también un conjugado seleccionado del grupo que consiste en conjugados plurales de aptámeros (a) anteriores, conjugados plurales de aptámeros (b) anteriores, y conjugados plurales de aptámeros (a) y (b) anteriores.

25 Preferidos de los anteriores (a) - (b) son (a) - (b) en donde la secuencia de nucleótidos se selecciona de las SEQ ID NO: 58, 59 o 60.

30 El número de nucleótidos sustituidos, suprimidos, insertados o añadidos no es más de 5, más preferiblemente 4, 3, 2 o 1. Se puede conseguir la conjugación por unión en tándem. En la conjugación, se puede utilizar un conector. Como conectores se pueden mencionar, cadenas de nucleótidos (p. ej., de 1 a aproximadamente 20 nucleótidos) y cadenas de no-nucleótidos (p. ej.,  $-(CH_2)_n$ -conector,  $-(CH_2CH_2O)_n$ -conector, conector hexaetilenglicol, conector TEG, conector que contiene péptido, conector que contiene enlace –S-S-, conector que contiene enlace –CONH-, conector que contiene enlace –OPO<sub>3</sub>-). La pluralidad, como se menciona en los conjugados plurales descritos anteriormente, no está particularmente limitada, con tal de que sean dos o más, y la pluralidad puede ser, por ejemplo, 2, 3 o 4.

35 Cada uno de los nucleótidos anteriores, sea el mismo o diferente, puede ser un nucleótido que comprende un grupo hidroxilo en la posición 2' de la ribosa, o un nucleótido sustituido por cualquier grupo (p. ej., átomo de hidrógeno, átomo de flúor o grupo –O-Me) en la posición 2' de la ribosa (p. ej., nucleótido de ribosa o pirimidina).

Por ejemplo, el aptámero de la presente invención puede ser un aptámero en donde los nucleótidos contenidos en los anteriores (a)-(b) son tales que:

- 40 i. cada posición 2' de la ribosa del nucleótido de pirimidina es la misma o diferente y está sustituida por un átomo de flúor o sustituida por cualquier átomo o grupo mencionado anteriormente, preferiblemente átomo o grupo seleccionado del grupo que consiste en átomo de hidrógeno, grupo hidroxilo y grupo metoxi; y
- ii. cada posición 2' de la ribosa del nucleótido de purina es la misma o diferente y está sustituida por un grupo hidroxilo o sustituida por cualquier átomo o grupo mencionado anteriormente, preferiblemente átomo o grupo seleccionado del grupo que consiste en átomo de hidrógeno, grupo metoxi y átomo de flúor.

45 La presente invención también proporciona el aptámero descrito anteriormente.

50 El aptámero puede ser uno en donde un resto de azúcar (p. ej., ribosa) de cada nucleótido se ha modificado para aumentar la actividad de unión de IL-17, estabilidad, administrabilidad del medicamento y similares. Como ejemplos de modificación en un resto de azúcar se pueden mencionar sustitución de un átomo de oxígeno en la posición 2', en la posición 3' y/o en la posición 4' del resto de azúcar con otro átomo, y similares. Como tipo de modificación se pueden mencionar fluoración, O-alkilación (p. ej., O-metilación, O-etilación), O-arilación, S-alkilación (p. ej., S-metilación, S-etilación), S-arilación, y aminación (p. ej.,  $-NH_2$ ). Tales alteraciones en el resto de azúcar se pueden realizar por un método conocido en sí mismo (advértase en, 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).

El aptámero también puede tener una base de ácido nucleico (p. ej., purina o pirimidina) alterada (p. ej., sustitución química) para aumentar la actividad de unión a IL-17 y similares. Como ejemplos de tales alteraciones, se pueden mencionar alteración de pirimidina en la posición 5, alteración de purina en la posición(es) 6 y/o posición 8, alteración con una amina extra-cíclica, sustitución con 4-thiouridina, y sustitución con 5-bromo o 5-yodo uracilo. El grupo fosfato contenido en el aptámero de la presente invención se puede alterar para conferir resistencia a nucleasa y a la hidrólisis. Por ejemplo, el grupo P(O)O se puede sustituir con P(O)S (tioato), P(S)S (ditioato), P(O)NR<sub>2</sub> (amidato), P(O)R, R(O)OR', CO o CH<sub>2</sub> (formacetal) o 3'-amina (-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-) [en donde cada unidad de R o R' es independientemente H o un alquilo sustituido o no sustituido (p. ej., metilo, etilo)].

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

Las alteraciones también pueden incluir alteraciones como el taponado en 3' y 5'.

Se puede además realizar una alteración añadiendo a un extremo polietilenglicol, un aminoácido, péptido, dT invertido, ácido nucleico, nucleósidos, Miristoil, oleil-litocólico, Docosanil, Lauril, Estearoil, Palmitoil, Oleoil, Linoleil, otros lípidos, esteroides, colesterol, cafeína, vitaminas, pigmentos, sustancias fluorescentes, agente anticancerígeno, toxina, enzimas, sustancia radioactiva, biotina y similares. Para tales alteraciones, adviértase, por ejemplo, en Patentes de E.E.U.U 5.660.985 y 5.756.703.

El aptámero de la presente invención se puede sintetizar químicamente como se describe en la presente memoria y mediante un método conocido en sí mismo en la técnica. Un aptámero se une a la molécula diana de una variedad de formas de unión, como enlaces iónicos basados en la carga negativa del grupo fosfato, enlaces hidrofóbicos y enlaces de hidrógeno basados en la ribosa, y enlaces de hidrógeno e interacción de apilamiento basados en las bases de ácido nucleico. En particular, los enlaces iónicos basados en la carga negativa del grupo fosfato, que están presentes en el mismo número que el número de nucleótidos constituyentes, son fuertes, y se unen a lisina y arginina que están presentes en la superficie de la carga positiva de la proteína. Por esta razón, se pueden sustituir las bases de ácido nucleico que no participan en la unión directa a la molécula diana. En particular, ya que la región de la estructura troncal ya se ha formado y encara el interior de la estructura de doble hélice, es poco probable que las bases de ácido nucleico se unan directamente a la molécula diana. Por lo tanto, incluso cuando un par de bases se reemplaza con otra pareja de bases, la actividad del aptámero frecuentemente no disminuye. En estructuras en donde no se forman pares de bases, como estructuras de bucle, es posible una sustitución de base siempre que la base de ácido nucleico no participe en la unión directa con la molécula diana. Respecto a las modificaciones en 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 de relevancia, y se puede sustituir por otra molécula modificada. Por lo tanto, un aptámero, a no ser que el grupo funcional implicado en la unión directa con la molécula diana esté sustituido o suprimido, retiene a menudo la actividad del mismo. Es importante también que la estructura tridimensional total no varíe ampliamente.

Un aptámero se puede preparar utilizando el método SELEX o una versión mejorada del mismo (por ejemplo, Ellington et al., (1990) Nature, 346, 818-822; Tuerk et al., (1990) Science, 249, 505-510). En el método SELEX, aumentando el número de rondas o usando una sustancia competidora, se concentra y se selecciona un aptámero que exhibe un fuerte potencial de unión por la molécula diana. Por lo tanto, ajustando el número de rondas de SELEX y/o cambiando la condición competitiva se pueden obtener en algunos casos aptámeros con diferentes fuerzas de unión, aptámeros con diferentes modos de unión, y aptámeros con la misma fuerza de unión o modo de unión pero diferentes secuencias de bases. El método SELEX comprende un proceso de amplificación por PCR; es posible realizar SELEX con mayor diversidad generando una mutación, usando iones de manganeso y similares en el proceso.

Los aptámeros obtenidos por SELEX son ácidos nucleicos que presentan alta afinidad por la molécula diana, pero esto no significa la unión de un sitio bio-activo de la molécula diana. Por lo tanto, los aptámeros obtenidos mediante SELEX no actúan necesariamente sobre la función de la sustancia diana. La IL-17 es una proteína básica, se cree que probablemente permite a los ácidos nucleicos unirse a la misma de manera no específica. Un aptámero que no se une a un sitio activo no influye en la actividad de la sustancia diana. De hecho, el RNA usado como control no inhibe la unión de IL-17 al receptor de IL-17.

El aptámero activo así seleccionado se puede someter a una optimización SELEX para alcanzar una alta funcionalidad. Para la optimización SELEX, un molde en donde un aptámero con una secuencia determinada se distribuye parcialmente al azar o se prepara un molde con información aproximadamente de 10 a 30% de secuencias aleatorias, y se realiza de nuevo el SELEX.

Un aptámero obtenido por SELEX tiene una longitud de aproximadamente 70 nucleótidos, y éste es difícil de preparar como un fármaco tal como está. Por lo tanto, es necesario repetir esfuerzos de ensayo y error para acortar el aptámero hasta una longitud de aproximadamente 50 nucleótidos o menos permitiendo una síntesis química fácil.

Dependiendo del diseño del iniciador para un aptámero obtenido por SELEX cambia la facilidad de la operación de minimización subsiguiente. A no ser que el iniciador se designe satisfactoriamente, será imposible el subsiguiente

desarrollo incluso si se selecciona por SELEX un aptámero con actividad. En la presente invención, se ha encontrado que se puede obtener un aptámero que retiene la actividad incluso con 23 nucleótidos (SEQ ID NO: 40) o con 33 nucleótidos (SEQ ID NO: 44), y estas secuencias son particularmente importantes para la unión con IL-17.

5 Los aptámeros son fácilmente modificables porque permiten síntesis química. Para aptámeros, prediciendo la estructura secundaria usando el programa MFOLD, o prediciendo la estructura estérica por análisis de rayos X, es posible predecir hasta cierto punto qué nucleótido se puede sustituir o suprimir, y dónde insertar un nuevo nucleótido. Un aptámero predicho con la nueva secuencia puede ser fácilmente sintetizado químicamente, y se puede determinar si el aptámero retiene o no la actividad usando un sistema de ensayo existente.

10 Si se identifica por esfuerzos repetidos de ensayo y error como se describió anteriormente una región importante del aptámero obtenido para la unión con la molécula diana, la actividad permanece en muchos casos sin alterar incluso cuando se añade una nueva secuencia a ambos extremos de la secuencia. La longitud de la nueva secuencia no está particularmente limitada.

Las modificaciones, como las secuencias, permiten un amplio intervalo de diseño o alteraciones.

15 Como se indicó anteriormente, los aptámeros permiten un amplio intervalo de diseño o alteraciones de modificaciones. Está descrito también un método de producción de aptámero que permite un amplio intervalo de diseño o de alteración de un aptámero que comprende una secuencia especificada (p. ej., una secuencia que corresponde a una porción seleccionada entre regiones troncales, regiones bucle internas, regiones bucle en horquilla y regiones de cadena sencilla: en lo sucesivo, abreviadas como secuencias fijas según sea necesario).

20 Por ejemplo, el método de producción de tal aptámero incluye la producción de un aptámero que comprende una secuencia fija usando una única clase de molécula de ácido nucleico que consiste en una secuencia de nucleótidos mostrada en:

Secuencia iniciadora (i) –(N)a- secuencia fija-(N)b- Secuencia iniciadora (ii)

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

La presente invención también proporciona un complejo que comprende el aptámero de la presente invención y una sustancia funcional unida a la misma. 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 donde están unidos el aptámero de la presente invención y una o más (p. ej., 2 o 3) de las  
35 sustancias funcionales de la misma clase o de diferentes clases. La sustancia funcional no está particularmente limitada, con tal de que confiera una cierta función al aptámero de la presente invención, o sea capaz de cambiar (p. ej., mejora) una cierta característica que puede poseer un aptámero de la presente invención. Como ejemplos de la sustancia funcional se pueden mencionar proteínas, péptidos, aminoácidos, lípidos, azúcares, monosacáridos, polinucleótidos y nucleótidos. Como ejemplos de la sustancia funcional se pueden mencionar sustancias de afinidad  
40 (p. ej., biotina, estreptavidina, polinucleótidos que poseen afinidad por la secuencia complementaria diana, anticuerpos, glutatión Sepharosa, histidina), sustancias para el marcaje (p. ej., sustancias fluorescentes, sustancias luminiscentes, radioisótopos), enzimas (p. ej., peroxidasa de rábano, fosfatasa alcalina), vehículos de administración de medicamentos (p. ej., liposomas, microesferas, péptidos, polietilenglicoles), medicamentos (p. ej., aquellos usados en terapia de misiles como calicheamicina y duocarmicina; análogos de gas nitrógeno como ciclofosfamida, melfalano, ifosfamida o trofosfamida; etileniminas como tiotepa; nitrosoureas como carmustina; agentes alquilantes como temozolomida o dacarbacina; antagonistas metabólicos tipo folato como metotrexato o raltitrexed; análogos de purina como tioguanina, cladribina o fludarabina; análogos de pirimidina como fluorouracilo, tegafur o gemcitabina; alcaloides vinca como vinblastina, vincristina o vinorelbina y análogos de los mismos; derivados de podofilotoxina como etoposido, taxanos, docetaxel o plactaxel; antraciclinas como doxorubicina, epirubicina, idarubicina y mitoxantrona, y análogos de los mismos; otros antibióticos citotóxicos como bleomicina y mitomicina; compuestos de platino como cisplatino, carboplatino y oxaliplatino; pentostatina, miltefosina, estramustina, topotecan, irinotecan y bicalutamida) y toxinas (p. ej., toxina ricina, liatoxina y Verotoxina). Estas moléculas funcionales se eliminan finalmente en algunos casos. Además, las moléculas pueden ser péptidos que pueden ser reconocidos y escindidos por enzimas como trombina, metaloproteinasa de la matriz (MMP), y Factor X, y pueden ser polinucleótidos que  
50 pueden ser escindidos por nucleasas o endonucleasa de restricción.

El aptámero o complejo de la presente invención se puede usar como, por ejemplo, un fármaco, medicamento de diagnóstico, medicamento de estudio, o reactivo. El mismo es particularmente útil como un fármaco, medicamento

de diagnóstico, medicamento de estudio, o reactivo para enfermedades autoinmunes y enfermedades acompañadas de inflamación.

5 Aquí, enfermedades autoinmunes y enfermedades acompañadas de inflamación incluyen esclerosis múltiple, lupus eritematoso sistémico (SLE), esclerodermia, síndrome de Sjögren, polimiositis (PM), dermatomiositis (DM), artritis reumática (artritis reumatoide crónica (RA), osteoartritis (OA)), enterocolitis inflamatoria (enfermedad de Crohn y similares), esclerosis progresiva sistémica (PSS), periartrosis nodosa (PN), enfermedades tiroideas (enfermedad de Basedow y similares), síndrome de Guillain-Barré, cirrosis biliar primaria (PBC), púrpura trombocitopénica idiopática, anemia hemolítica autoinmune, miastenia gravis (MG), esclerosis lateral amiotrófica (ALS), diabetes tipo I, psoriasis, asma, anormalidades funcionales de neutrófilos, neumonía eosinofílica, fibrosis pulmonar repentina, neumonitis por  
10 hipersensibilidad, cáncer esofágico, cáncer tiroideo, cáncer de vejiga, cáncer colorectal, cáncer gástrico, cáncer pancreático, cáncer de pecho, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, cáncer de pulmón no microcítico, cáncer de mama, neuroblastoma, neurogloma, glioblastoma, cáncer uterino, cáncer cervical uterino, cáncer de ovario, tumor de Wilms, cáncer de próstata, rechazo del injerto en trasplantes, enfermedad injerto contra huésped, asma, rinitis alérgica, dermatitis atópica, hipersensibilidad alimentaria, urticaria, adherencias postquirúrgicas, endometriosis, periodontitis adulta, bronquitis, COPD, enfermedades infecciosas y similares. En particular, se pueden mencionar  
15 esclerosis múltiple, artritis reumática, enterocolitis inflamatoria, escleroderma, asma y enfermedad de injerto contra huésped.

El aptámero o complejo de la presente invención se puede también usar como un vehículo de administración de medicamento, una sonda para imágenes in vivo, una sonda para la determinación de las concentraciones  
20 sanguíneas de IL-17, una sonda para tinción histológica, una sonda para ELISA, y un ligando para la separación y purificación de IL-17.

Se sabe que IL-17 actúa sobre varias células como fibroblastos, células endoteliales, células epiteliales, condrocitos, osteoblastos, células progenitoras de células dendríticas, células intersticiales derivadas de la médula, células T, macrófagos, y neutrófilos. La IL-17 induce la producción y expresión de varias citoquinas, quimioquinas y receptores  
25 actuando en sobre estas células. Específicamente, se pueden mencionar CXCL1 (KC o Gro $\alpha$ ), CXCL2 (MIP2 o Gro $\beta$ ), CXCL5 (LIX), CXCL6 (GCP-2), CXCL8 (IL-8), CXCL9 (MIG), CXCL10 (IP10), CXCL11 (I-TAC), CCL2 (MCP-1), CCL5 (RANTES), CCL7 (MCP-3), CCL11 (Eotaxina), CXCL12 (SDF-1), CCL20 (MIP3 $\alpha$ ), IL-1, IL-6, IL-8, IL-19, TNF, CSF2 (GM-CSF), CSF3 (G-CSF), ICAM-1, VCAM-1, PTGS2 (COX2), NOS2 (iNOS), LCN2 (24p3), DEFB4 (BD2), S100A7 (Psoriasisina), S100A8 (Calgranulina A), S100A9 (Calgranulina B), MUC5AC, MUC5B, EREG, SOCS3, TNFSF11 (RANKL), MMP1, MMP3, MMP9, MMP13, TIMP1, ADAMTS4, PEG2, SCF, CD80, CD86, MHC y  
30 similares. Por lo tanto, el aptámero o complejo de la presente invención se puede usar como un fármaco, medicamento de diagnóstico, medicamento de estudio, o reactivo para enfermedades asociadas con estas células y citoquinas, quimioquinas y similares.

Mediante la unión a un receptor de la misma, IL-17 activa Act1 y TRAF6, y activa la vía de NF- $\kappa$ B, vía de la MAP  
35 quinasa, vía de C/EBP y similares. Por lo tanto, el aptámero o el complejo de la presente invención se puede usar como un fármaco, medicamento diagnóstico, medicamento de estudio, o reactivo para enfermedades asociadas con la activación de estas vías de transducción de señal.

El aptámero o complejo de la presente invención también puede ser para usar en un método de prevención o  
40 tratamiento de una amplia gama de enfermedades, que incluyen enfermedades autoinmunes (p. ej., esclerosis múltiple, lupus eritematoso sistémico (SLE), esclerodermia, síndrome de Sjögren, polimiositis (PM), dermatomiositis (DM), artritis reumática (artritis reumatoide crónica (RA), osteoartritis (OA)), enterocolitis inflamatoria (enfermedad de Crohn y similares), esclerosis progresiva sistémica (PSS), periartrosis nodosa (PN), enfermedades tiroideas (enfermedad de Basedow y similares), síndrome de Guillain-Barré, cirrosis biliar primaria (PBC), púrpura trombocitopénica idiopática, anemia hemolítica autoinmune, miastenia gravis (MG), esclerosis lateral amiotrófica (ALS), diabetes tipo I, psoriasis, asma, anormalidades funcionales de neutrófilos, neumonía eosinofílica, fibrosis pulmonar repentina, neumonitis por hipersensibilidad, cánceres (p. ej., cáncer esofágico, cáncer tiroideo, cáncer de vejiga, cáncer colorectal, cáncer gástrico, cáncer pancreático, cáncer de pecho, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, cáncer de pulmón no microcítico, cáncer de mama, neuroblastoma, neurogloma, glioblastoma, cáncer uterino, cáncer cervical uterino, cáncer de ovario, tumor de Wilms, cáncer de próstata), enfermedades del trasplante  
45 (p. ej., rechazos del injerto, enfermedad injerto contra huésped), alergias (p. ej., asma, rinitis alérgica, dermatitis atópica, hipersensibilidad alimentaria, urticaria), otras enfermedades relacionadas con la inflamación (p. ej., adherencias postquirúrgicas, endometriosis, periodontitis adulta, bronquitis, COPD), enfermedades infecciosas y similares. En particular, el aptámero de la presente invención se puede usar para prevenir o tratar esclerosis múltiple, artritis reumática, enterocolitis inflamatoria, esclerodermia, asma y enfermedad de injerto contra huésped.

55 El fármaco de la presente invención puede ser uno formulado con un excipiente farmacéuticamente aceptable. Como ejemplos de los excipientes farmacéuticamente aceptables se pueden mencionar, excipientes como sacarosa, almidón, manitol, sorbitol, lactosa, glucosa, celulosa, talco, fosfato cálcico, y carbonato cálcico; aglutinantes como celulosa, metilcelulosa, hidroxilpropilcelulosa, polipropilpirrolidona, gelatina, goma arábiga, polietilenglicol, sacarosa, y almidón; disgregantes como almidón, carboximetilcelulosa, hidroxipropilalmidón, glicolato de almidón sódico, bicarbonato de sodio, fosfato cálcico, y citrato cálcico; lubricantes como estearato de magnesio, Aerosil, talco, y laurilsulfato sódico; agentes aromatizantes como ácido cítrico, mentol, sal amónica de glicirricina,  
60

glicina, y polvo de naranja; conservantes como benzoato sódico, bisulfito de sodio, metilparabeno, y propilparabeno; estabilizadores como ácido cítrico, citrato sódico, y ácido acético; agentes de suspensión como metilcelulosa, polivinilpirrolidona, y estearato de aluminio; agentes dispersantes como surfactantes; diluyentes como agua, solución salina fisiológica, y zumo de naranja; ceras de base como manteca de cacao, polietilenglicol, y queroseno; y similares, aunque estos no son limitantes.

Preparaciones adecuadas para la administración oral son una solución preparada disolviendo una cantidad efectiva de ligando en un diluyente como agua, solución salina fisiológica, o zumo de naranja; cápsulas, bolsitas o tabletas que comprenden una cantidad efectiva de ligando en forma sólida o granular; una suspensión preparada por suspensión de una cantidad efectiva de ingrediente activo en un dispersante apropiado; una emulsión preparada dispersando y emulsionando una solución de una cantidad efectiva de ingrediente activo en un dispersante apropiado, y similares.

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

Como preparaciones adecuadas para administración parenteral (por ejemplo, administración intravenosa, administración subcutánea, administración intramuscular, administración tópica, administración intraperitoneal, administración intranasal, administración pulmonar y similares) están disponibles líquidos inyectables estériles isotónicos acuosos y no acuosos, que pueden comprender un antioxidante, una solución tampón, un agente bacteriostático, un agente isotonzante, y similares. También se pueden mencionar suspensiones estériles acuosas y no acuosas, que pueden comprender un agente de suspensión, un solubilizante, un espesante, un estabilizante, un antiséptico y similares. Se puede incluir la preparación en un envase como una ampolla o un vial en volumen de dosificación unitaria o en varias dosis divididas. Un ingrediente activo y un excipiente farmacéuticamente aceptable también puede ser liofilizado y almacenado en un estado que se puede disolver o suspender en un vehículo estéril apropiado antes de su uso. Además de inyecciones líquidas también se aceptan, inhalantes y ungüentos. En el caso de un inhalante, se microniza y se administra mediante inhalación un ingrediente activo en estado liofilizado usando un dispositivo de inhalación apropiado. Un inhalante se puede formular como adecuado con surfactantes usados convencionalmente, aceite, condimento, ciclodextrina o derivados de la misma y similares, según sea necesario.

Aquí, como ejemplos de tensioactivos, se pueden mencionar ácido oleico, lecitina, dietilenglicol dioleato, tetrahidrofuril oleato, etil oleato, isopropil miristato, gliceril trioleato, gliceril monolaurato, gliceril monooleato, gliceril monoesterato, gliceril monolisionato, alcohol cetílico, estearil alcohol, polietilenglicol 400, cloruro de cetilpiridinio, trioleato de sorbitán (nombre comercial, Span 85), monooleato de sorbitán (nombre comercial, Span 80), monolaurato de sorbitán (marca comercial, Span 20), polioxietileno endurecido con aceite de ricino (nombre comercial, HCO-60), polioxietileno (20) sorbitán monolaurato (nombre comercial, Tween 20), polioxietileno (20) sorbitán monooleato (nombre comercial, Tween 80), lecitina de origen de recursos naturales (nombre comercial, EPICLON), polioxietileno (2) oleil éter (nombre comercial, Brij 92), polioxietileno(2) estearil éter (nombre comercial, Brij 72), polioxietileno(4) lauril éter (nombre comercial, Brij 30), oleilpolioxietileno (2) éter (nombre comercial, Genapol 0-020), copolímero bloqueado de oxetileno y oxipropileno (nombre comercial, Synperonic) y similares. Como ejemplos de aceite se pueden mencionar, aceite de maíz, aceite de oliva, aceite de algodón, aceite de girasol y similares. En el caso de un ungüento, una base farmacéuticamente aceptable (vaselina amarilla, vaselina blanca, parafina, plastibase, silicona, ungüento blanco, cera de abejas, manteca de cerdo, aceites vegetales, ungüento hidrofílico, vaselina hidrofílica, lanolina purificada, lanolina hidrolizada, ungüento que absorbe agua, plastibase hidrofílica, ungüento macrogol y similares) se mezcla con un ingrediente activo, y se usa como una preparación.

Se puede fabricar un inhalante según un método convencional. Específicamente, se puede fabricar un inhalante por espolvoreado o licuado del aptámero o complejo de la presente invención anteriormente descrito mezclándolo con un propulsor de inhalación y/o excipiente, y llenándolos en un recipiente de inhalación apropiado. Cuando el aptámero o complejo de la presente invención descrito anteriormente es un polvo, se puede usar un inhalador de polvo mecánico; en el caso de un líquido, se puede usar un inhalador como un nebulizador. Aquí, como propulsor, puede ser uno convencionalmente conocido ampliamente usado; se pueden mencionar compuestos de las series de clorofluorocarbono como clorofluorocarbono-11, clorofluorocarbono-12, clorofluorocarbono-21, clorofluorocarbono-22, clorofluorocarbono-113, clorofluorocarbono-114, clorofluorocarbono-123, clorofluorocarbono-142c, clorofluorocarbono-134a, clorofluorocarbono-227, clorofluorocarbono-C318, y 1, 1, 1, 2-tetrafluoroetano, hidrocarburos como propano, isobutano, y n-butano, éteres como dietil éter, gases comprimidos como gas nitrógeno y gas dióxido de carbono y similares.

La dosis del fármaco de la presente invención varía dependiendo de la clase y la actividad del ingrediente activo, gravedad de la enfermedad, especies animales que son sujeto de la administración, la tolerancia del medicamento del sujeto de administración, peso corporal, edad y similares, y la dosis 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.

5 También se describe un portador de fase sólida que tiene un aptámero o el complejo de la presente invención inmovilizado sobre el mismo. Como ejemplos de portadores de fase sólida se pueden mencionar, un sustrato, una resina, una placa (p. ej., placa multipocillo), un filtro, un cartucho, una columna, y un material poroso. El sustrato puede ser uno usado en chips de DNA, chips de proteína y similares; por ejemplo, se pueden mencionar, sustratos de níquel-PTFE (politetrafluoroetileno), sustratos de vidrio, sustratos de apatito, sustratos de silicio, sustratos de alúmina y similares, y sustratos preparados por recubrimiento de estos sustratos con un polímero y similares. Como  
10 ejemplos de la resina se pueden mencionar, partículas de agarosa, partículas de sílice, un copolímero de acrilamida y N,N'-metilenbisacrilamida, partículas de divinilbenceno entrecruzadas con poliestireno, partículas de dextrano entrecruzadas con epíclorhidrina, fibra de celulosa, polímeros entrecruzados de arildextrano y N,N'-metilenbisacrilamida, polímeros sintéticos monodispersos, polímeros hidrofílicos monodispersos, Sepharosa, Toyopearl y similares, y también se incluyeron resinas preparadas por unión de varios grupos funcionales a estas resinas. El portador de fase sólida de la presente invención puede ser útil en, por ejemplo, purificación, detección y  
15 cuantificación de IL-17.

El aptámero o el complejo de la presente invención se puede inmovilizar sobre un portador de fase sólida por un método conocido en sí mismo. Por ejemplo, se pueden mencionar un método que introduce una sustancia de afinidad (p. ej., aquellas anteriormente descritas) o un grupo funcional predeterminado dentro del aptámero o del  
20 complejo de la presente invención, e inmovilizando después el aptámero o complejo sobre un portador de fase sólida a través de la sustancia de afinidad o del grupo funcional predeterminado. La presente invención 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 pueden mencionar, un grupo amino, un grupo tiol, un grupo hidroxilo, y un grupo carboxilo. La presente invención también proporciona un aptámero que posee tal grupo funcional  
25 introducido al mismo.

La presente invención también proporciona un método de purificación y de concentración de IL-17. En particular, la presente invención lo hace posible el separar IL-17 de las proteínas de otras familias de proteínas. El método de purificación y concentración de la presente invención puede comprender la adsorción de IL-17 al portador de fase sólida, y la elución de IL-17 adsorbida con un eluyente. La adsorción de IL-17 al portador de fase sólida de la presente invención se puede lograr mediante un método conocido en sí mismo. Por ejemplo, se introduce una muestra que contiene IL-17 (p. ej., cultivo bacteriano o celular o sobrenadante de cultivo, sangre) dentro del portador de fase sólida de la presente invención o una composición que contiene la misma. Se puede eluir IL-17 usando un eluyente como una solución neutra. No existe limitación en el eluyente neutro, que tiene un pH de, por ejemplo, aproximadamente de 6 a aproximadamente 9, preferiblemente aproximadamente de 6,5 a aproximadamente 8,5, y  
30 más preferiblemente aproximadamente de 7 a aproximadamente 8. La solución neutra puede también comprender, por ejemplo, una sal sódica (p. ej., NaCl), una sal potásica (p. ej., KCl), una sal magnésica (p. ej., MgCl<sub>2</sub>), un tensioactivo (p. ej., Tween 20, Tritón NP40), y glicerina. El método de purificación y concentración de la presente invención puede comprender además lavado del portador de fase sólida usando una solución de lavado después de la adsorción de IL-17. Ejemplos de la solución de lavado incluyen aquellas que contienen urea, un agente quelante (p. ej., EDTA), Tris, un ácido, un álcali, RNA de transferencia, DNA, tensioactivos como Tween 20, sales como NaCl y similares. El método de purificación y concentración de la presente invención todavía puede comprender además el calentamiento del portador de fase sólida. Esta etapa permite la regeneración y esterilización del portador de fase sólida.

El aptámero o complejo de la presente invención se puede utilizar como una sonda de detección, particularmente como una sonda para la detección de IL-17. El método de marcaje del aptámero no está particularmente limitado; se pueden aplicar métodos conocidos en sí mismos. Tales métodos incluyen, por ejemplo, marcaje con un radioisótopo, marcaje con un colorante fluorescente o proteína fluorescente, y similares.

La presente invención también proporciona un método de detección de IL-17. En particular, la presente invención hace posible detectar y cuantificar por separado IL-17 de las proteínas de otras proteínas de la familia. El método de  
50 detección y cuantificación de la presente invención puede comprender la medida de IL-17 utilizando el aptámero de la presente invención (p. ej., por el uso del complejo y el portador de fase sólida de la presente invención). El método de detección y cuantificación de IL-17 se puede realizar de la misma manera que un método inmunológico, excepto que se usa el aptámero de la presente invención en lugar de un anticuerpo. Por lo tanto, usando el aptámero de la presente invención como sonda en lugar de un anticuerpo, se pueden realizar de la misma manera que tales métodos como, enzimoimmunoensayo (EIA) (p. ej., ELISA competitivo directo, ELISA competitivo indirecto, ELISA sándwich), radioimmunoensayo (RIA), inmunoensayo fluorescente (FIA), usar en lugar de un anticuerpo secundario en la técnica de transferencia de Western, método de tinción inmunohistoquímico, método separación celular, detección y cuantificación. Estos métodos pueden ser útiles en, por ejemplo, medida del contenido de IL-17 en muestras de organismos vivos o biológicas, y en diagnóstico de una enfermedad asociada con IL-17.

60 La presente invención se describe con más detalle de aquí en adelante en esta memoria por medio de los siguientes Ejemplos, los que, sin embargo, nunca limitan el alcance de la invención.

## Ejemplos

Ejemplo 1: Preparación de ácidos nucleicos que se unen específicamente a IL-17

Se prepararon ácidos nucleicos que se unen específicamente a IL-17 usando el método SELEX. Se realizó SELEX con mejoras del método de Ellington et al. (Ellington and Szostak, *Nature* 346, 818-822, 1990) y el método de Tuerk et al. (Tuerk and Gold, *Science* 249, 505-510, 1990). Se usó IL-17 humana (producida por Preprotech Company) como sustancia diana. Se inmovilizó IL-17 en resina de agarosa (Sepharosa activada NHS), producida por GE Healthcare) mediante acoplamiento del amino. El acoplamiento del amino se realizó como se indica en las especificaciones de GE Healthcare Company. La cantidad inmovilizada se confirmó mediante examen de la solución de IL-17 antes de la inmovilización y del sobrenadante justo después de la inmovilización mediante SDS-PAGE. Como resultado de la SDS-PAGE, no se detectó ninguna banda de IL-17 en el sobrenadante; se confirmó que se había acoplado casi toda IL-17 usada. Esto significa que se inmovilizaron aproximadamente 400 pmol de IL-17 a 10 µl de la resina.

El RNA usado en la primera ronda (30N-RNA) se obtuvo por transcripción de un DNA químicamente sintetizado usando el Kit de Transcripción DuraScribe™ T7 (fabricado por Epicentre). El RNA obtenido por este método tiene la posición 2' de la ribosa del nucleótido de pirimidina sustituida por flúor. Se usó como DNA molde el siguiente DNA de 89 nucleótidos de largo, que tiene una secuencia iniciadora a cada extremo de una secuencia aleatoria de 30 nucleótidos. El DNA molde y los cebadores usados se prepararon mediante síntesis química. El DNA molde y los cebadores usados se muestran a continuación.

DNA molde:

5'-tcacactagcacgcatagg-30N-catctgacctctctctctccc-3' (SEQ ID NO: 55)

Cebador sentido:

5'-taatacagctcactatagggagcaggagagaggtcagatg-3' (SEQ ID NO: 56)

Cebador reverso:

5'-tcacactagcacgcatagg-3' (SEQ ID NO: 57)

N represente cualquiera de A, G, C y T. El iniciador hacia delante comprende una secuencia promotora de la RNA polimerasa de T7. La variación del grupo de RNA usado en la primera ronda era teóricamente  $10^{14}$ .

Acto seguido se añadió el grupo de RNA a la resina con IL-17 inmovilizada y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 30 minutos. Después de 30 minutos, se lavó la resina con solución A para separar el RNA no unido a IL-17. En este caso, la solución A es una solución mixta de cloruro sódico 145 mM, cloruro potásico 5,4 mM, cloruro cálcico 1,8 mM, cloruro magnésico 0,8 mM, Tris 20 mM (pH 7,6), y Tween 20 al 0,05%. El RNA unido a IL-17 se recuperó por agitación con la adición de un eluyente a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se usó la solución A como eluyente después de ser ajustado a pH 7,6 mediante la adición de hidrócloruro de guanidinio 6 M. El RNA recuperado se amplificó mediante RT-PCR y se transfirió usando el Kit de Transcripción DuraScribe™ T7, y este se usó como el grupo para la siguiente ronda. Cada ronda de estas etapas se repitió durante 8 rondas. Después de la finalización de SELEX, se clonó el producto de PCR dentro de un vector Easy pGEM-T (producido por Promega), y con eso se transformó la cepa de *Escherichia coli* DH5α (producida por Toyobo). Después de que se extrajo el plásmido de una sola colonia, se examinaron 48 clones para secuenciación de bases usando un secuenciador de DNA (3130x1 Genetic Analyzer, producido por ABI).

Después de que se realizó SELEX durante 6 rondas, se examinaron las secuencias; se vio la convergencia de secuencia. Existían 11 secuencias mostradas en la SEQ ID NO: 1, y estaba presente una secuencia con una sustitución de dos bases. Existían seis secuencias mostradas en la SEQ ID NO: 2. Existían dos secuencias mostradas en las SEQ ID NO: 3-6. Existía una secuencia mostrada en las SEQ ID NO: 7-28. En las secuencias mostradas en la SEQ ID NO: 1 y 2, se contenía la secuencia común gauagcgaagucauugagcgc (SEQ ID NO: 58; 21 nucleótidos). En las secuencias mostradas en las SEQ ID NO: 6-21, se contenía la secuencia común ggagucag (SEQ ID NO: 59; 8 nucleótidos). Cuando se predicen las estructura secundarias de las secuencias mostradas en las SEQ ID NO: 1 y 2 usando el programa MFOLD (M. Zuker, *Nucl. Ac. Res.* 31(13), 3406-3415, 2003), se encontró que las porciones de secuencia común eran morfológicamente idénticas (advértase en Figs. 1 y 2).

Después, se examinaron las secuencias obtenidas después de ocho rondas de SELEX. Se observó una mayor convergencia que con las seis rondas; existían las secuencias 25 y 7 mostradas en las SEQ ID NO: 1 y 2, respectivamente. Existía una secuencia resultante de una sustitución de 2 bases de la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 1, y existía una secuencia resultante de una sustitución de 1 base de la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 2. Existían cuatro, tres y dos secuencias mostradas en las SEQ ID NO: 29-31, respectivamente. Existía una secuencia mostrada en las SEQ ID NO: 32-36. La secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 29 comprende la secuencia común SEQ ID NO: 58. Cuando se predice la estructura secundaria de la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 29 usando el programa MFOLD, se encontró que la porción de secuencia común era morfológicamente

idéntica a la secuencia común contenida en las secuencias mostradas en las SEQ ID NO: 1 y 2 (advértase en Fig. 3). Las secuencias mostradas en las SEQ ID NO: 30 y 31 contenían la secuencia común de la SEQ ID NO: 59. Además, las secuencias mostradas en las SEQ ID NO: 7, 9, 13, 21 y 30 contenían la secuencia común ggaggagucaguaauc (SEQ ID NO: 60; 16 nucleótidos). La secuencia común mostrada en la SEQ ID NO: 60 comprende la SEQ ID NO: 59. Cuando se predijeron las estructuras secundarias de estas secuencias usando el programa MFOLD, se encontró que las porciones de secuencia común eran morfológicamente idénticas (advértase en Figs. 4-6). Las bases de la secuencia común mostradas en la SEQ ID NO: 59 están recuadradas, y las bases de la secuencia restante de la secuencia común mostrada en la SEQ ID NO: 60 están marcadas con \*s (asteriscos).

Se muestran a continuación las respectivas secuencias de nucleótidos. El paréntesis de cada nucleótido indica una modificación en la posición 2' de la ribosa. F representa un átomo de flúor, y M representa OMe. Específicamente, c(F) representa citidina en donde la posición 2' de la ribosa está sustituida por un átomo de flúor, y u(F) representa uridina en donde la posición 2' de la ribosa está sustituida por un átomo de flúor. a(M) representa adenosina en donde la posición 2' de la ribosa está sustituida por OMe, g(M) representa guanosina en donde la posición 2' de la ribosa está sustituida por OMe, y c(M) representa citidina en donde la posición 2' de la ribosa está sustituida por OMe (lo mismo se aplica a continuación).

El principio de cada secuencia es el extremo 5', y el final es el extremo 3'.

SEQ ID NO: 1:

gggagc(F)aggagagaggu(F)c(F)agau(F)gggc(F)agc(F)agaggau(F)agc(F)gaagu(F)c(F)au(F)u(F)gagc(F)gc(F)c(F)u(F)au(F)gc(F)gu(F)gc(F)u(F)agu(F)gu(F)ga

20 SEQ ID NO: 2:

gggagc(F)aggagagaggu(F)c(F)agau(F)ggu(F)gc(F)ac(F)au(F)gggau(F)agc(F)gaagu(F)c(F)au(F)u(F)gagc(F)gc(F)c(F)u(F)au(F)gc(F)gu(F)gc(F)u(F)agu(F)gu(F)ga

SEQ ID NO: 3:

25 gggagc(F)aggagagaggu(F)c(F)agau(F)gu(F)gu(F)aaggu(F)c(F)ggaagu(F)c(F)au(F)gaac(F)ggc(F)c(F)c(F)ggac(F)c(F)u(F)au(F)gc(F)gu(F)gc(F)u(F)agu(F)gu(F)ga

SEQ ID NO: 4:

gggagc(F)aggagagaggu(F)c(F)agau(F)gc(F)u(F)au(F)agc(F)gaagu(F)c(F)au(F)u(F)gagc(F)gagac(F)au(F)aggc(F)c(F)u(F)au(F)gc(F)gu(F)gc(F)u(F)agu(F)gu(F)ga

SEQ ID NO: 5:

30 gggagc(F)aggagagaggu(F)c(F)agau(F)gagc(F)gc(F)c(F)au(F)agggau(F)agagaagc(F)c(F)au(F)u(F)gau(F)c(F)ac(F)c(F)u(F)au(F)gc(F)gu(F)gc(F)u(F)agu(F)gu(F)ga

SEQ ID NO: 6:

gggagc(F)aggagagaggu(F)c(F)agau(F)ggu(F)gau(F)gc(F)au(F)aggagu(F)ggagu(F)c(F)agau(F)au(F)agc(F)c(F)c(F)u(F)au(F)gc(F)gu(F)gc(F)u(F)agu(F)gu(F)ga

35 SEQ ID NO: 7:

gggagc(F)aggagagaggu(F)c(F)agau(F)gu(F)gu(F)ac(F)gu(F)u(F)aggagggaggagu(F)c(F)agu(F)aa(F)c(F)gc(F)c(F)u(F)au(F)gc(F)gu(F)gc(F)u(F)agu(F)gu(F)ga

SEQ ID NO: 8:

40 gggagc(F)aggagagaggu(F)c(F)agau(F)ggaggagu(F)c(F)agc(F)aa(F)c(F)gu(F)u(F)ggc(F)c(F)u(F)u(F)c(F)u(F)gc(F)gac(F)c(F)u(F)au(F)gc(F)gu(F)gc(F)u(F)agu(F)gu(F)ga

SEQ ID NO: 9:

gggagc(F)aggagagaggu(F)c(F)agau(F)ggaggagu(F)c(F)agu(F)aa(F)c(F)gu(F)u(F)ggc(F)c(F)c(F)u(F)gc(F)u(F)u(F)c(F)ac(F)c(F)u(F)au(F)gc(F)gu(F)gc(F)u(F)agu(F)gu(F)ga

SEQ ID NO: 10:

45 gggagc(F)aggagagaggu(F)c(F)agau(F)ggaggagu(F)c(F)agu(F)gau(F)c(F)agu(F)gac(F)c(F)u(F)c(F)u(F)u(F)gu(F)ggc(F)c(F)u(F)au(F)gc(F)gu(F)gc(F)u(F)agu(F)gu(F)ga

SEQ ID NO: 11:

gggagc(F)aggagagaggu(F)c(F)agau(F)ggu(F)ggagu(F)c(F)agu(F)gagc(F)gu(F)u(F)gac(F)c(F)ggc(F)aau(F)c(F)ac(F)c(F)u(F)u(F)au(F)gc(F)gu(F)gc(F)u(F)agu(F)gu(F)ga

SEQ ID NO: 12:

5 gggagc(F)aggagagaggu(F)c(F)agau(F)ggaggagu(F)c(F)agu(F)gau(F)c(F)gu(F)u(F)gc(F)c(F)ggac(F)u(F)u(F)gc(F)c(F)c(F)c(F)u(F)u(F)au(F)gc(F)gu(F)gc(F)u(F)agu(F)gu(F)ga

SEQ ID NO: 13:

gggagc(F)aggagagaggu(F)c(F)agau(F)ggaggagu(F)c(F)agu(F)aau(F)c(F)gu(F)u(F)gaac(F)c(F)ggagc(F)au(F)c(F)c(F)c(F)u(F)u(F)au(F)gc(F)gu(F)gc(F)u(F)agu(F)gu(F)ga

SEQ ID NO: 14:

10 gggagc(F)aggagagaggu(F)c(F)agau(F)gau(F)gac(F)aggagu(F)c(F)agau(F)au(F)au(F)gc(F)ac(F)au(F)u(F)u(F)gac(F)c(F)c(F)u(F)u(F)au(F)gc(F)gu(F)gc(F)u(F)agu(F)gu(F)ga

SEQ ID NO: 15:

gggagc(F)aggagagaggu(F)c(F)agau(F)ggu(F)u(F)aggu(F)ggagu(F)c(F)agggaaaaaac(F)c(F)gu(F)u(F)u(F)gc(F)c(F)u(F)u(F)au(F)gc(F)gu(F)gc(F)u(F)agu(F)gu(F)ga

15 SEQ ID NO: 16:

gggagc(F)aggagagaggu(F)c(F)agau(F)gu(F)agagu(F)ggagu(F)c(F)agau(F)au(F)agc(F)c(F)u(F)ac(F)aagu(F)c(F)c(F)c(F)c(F)u(F)u(F)au(F)gc(F)gu(F)gc(F)u(F)agu(F)gu(F)ga

SEQ ID NO: 17:

20 gggagc(F)aggagagaggu(F)c(F)agau(F)gu(F)aau(F)aggggagu(F)c(F)agau(F)au(F)ac(F)c(F)aac(F)gaagac(F)c(F)u(F)a u(F)gc(F)gu(F)gc(F)u(F)agu(F)gu(F)ga

SEQ ID NO: 18:

gggagc(F)aggagagaggu(F)c(F)agau(F)gu(F)aggu(F)gu(F)gagu(F)ggagu(F)c(F)agaaau(F)agc(F)c(F)gc(F)ac(F)c(F)u(F)u(F)au(F)gc(F)gu(F)gc(F)u(F)agu(F)gu(F)ga

SEQ ID NO: 19:

25 gggagc(F)aggagagaggu(F)c(F)agau(F)gc(F)gau(F)c(F)gu(F)ac(F)gc(F)ggggggggagu(F)c(F)agau(F)au(F)ac(F)c(F)u(F)u(F)au(F)gc(F)gu(F)gc(F)u(F)agu(F)gu(F)ga

SEQ ID NO: 20:

gggagc(F)aggagagaggu(F)c(F)agau(F)gu(F)gau(F)agu(F)ac(F)gc(F)ggaaggggagu(F)c(F)agau(F)au(F)ac(F)c(F)u(F)a u(F)gc(F)gu(F)gc(F)u(F)agu(F)gu(F)ga

30 SEQ ID NO: 21:

gggagc(F)aggagagaggu(F)c(F)agau(F)gc(F)aaggaggagu(F)c(F)agu(F)aau(F)c(F)gu(F)gac(F)au(F)u(F)ggc(F)c(F)c(F)c(F)u(F)u(F)au(F)gc(F)gu(F)gc(F)u(F)agu(F)gu(F)ga

SEQ ID NO: 22:

35 gggagc(F)aggagagaggu(F)c(F)agau(F)gc(F)u(F)au(F)gc(F)c(F)gc(F)ac(F)aaac(F)ac(F)gu(F)au(F)gagu(F)gc(F)u(F)c(F)ac(F)c(F)u(F)u(F)au(F)gc(F)gu(F)gc(F)u(F)agu(F)gu(F)ga

SEQ ID NO: 23:

gggagc(F)aggagagaggu(F)c(F)agau(F)ggu(F)u(F)ac(F)u(F)u(F)c(F)c(F)c(F)c(F)aaaagu(F)c(F)au(F)aaau(F)ggggg(F)u(F)ac(F)c(F)u(F)u(F)au(F)gc(F)gu(F)gc(F)u(F)agu(F)gu(F)ga

SEQ ID NO: 24:

40 gggagc(F)aggagagaggu(F)c(F)agau(F)ggaggagac(F)agu(F)aau(F)c(F)gu(F)u(F)gac(F)c(F)gc(F)u(F)u(F)c(F)gu(F)gc(F)c(F)u(F)u(F)au(F)gc(F)gu(F)gc(F)u(F)agu(F)gu(F)ga

SEQ ID NO: 25:

gggagc(F)aggagagaggu(F)c(F)agau(F)gu(F)gau(F)agc(F)gaaggc(F)au(F)u(F)gagc(F)gc(F)ac(F)au(F)u(F)aaac(F)c(F)u(F)au(F)gc(F)gu(F)gc(F)u(F)agu(F)gu(F)ga

SEQ ID NO: 26:

5 gggagc(F)aggagagaggu(F)c(F)agau(F)gggc(F)agc(F)agaggau(F)gc(F)gaagu(F)c(F)au(F)u(F)gagc(F)gc(F)c(F)u(F)au(F)gc(F)gu(F)gc(F)u(F)agu(F)gu(F)ga

SEQ ID NO: 27:

gggagc(F)aggagagaggu(F)c(F)agau(F)gc(F)c(F)u(F)ggu(F)aggc(F)gu(F)agagaagu(F)c(F)au(F)u(F)gau(F)c(F)agc(F)c(F)u(F)au(F)gc(F)gu(F)gc(F)u(F)agu(F)gu(F)ga

SEQ ID NO: 28:

10 gggagc(F)aggagagaggu(F)c(F)agau(F)gu(F)u(F)au(F)aaaagc(F)u(F)u(F)aagu(F)gc(F)u(F)gu(F)c(F)aac(F)u(F)u(F)c(F)u(F)ac(F)c(F)u(F)au(F)gc(F)gu(F)gc(F)u(F)agu(F)gu(F)ga

SEQ ID NO: 29:

gggagc(F)aggagagaggu(F)c(F)agau(F)gc(F)gau(F)agc(F)gaagu(F)c(F)au(F)u(F)gagc(F)gc(F)gu(F)gu(F)c(F)c(F)aac(F)c(F)u(F)au(F)gc(F)gu(F)gc(F)u(F)agu(F)gu(F)ga

15 SEQ ID NO: 30:

gggagc(F)aggagagaggu(F)c(F)agau(F)ggu(F)c(F)u(F)agc(F)c(F)ggaggagu(F)c(F)agu(F)aau(F)c(F)ggu(F)agac(F)c(F)u(F)au(F)gc(F)gu(F)gc(F)u(F)agu(F)gu(F)ga

SEQ ID NO: 31:

20 gggagc(F)aggagagaggu(F)c(F)agau(F)ggaagu(F)ggagu(F)c(F)agau(F)au(F)agc(F)aau(F)au(F)u(F)au(F)gac(F)c(F)u(F)au(F)gc(F)gu(F)gc(F)u(F)agu(F)gu(F)ga

SEQ ID NO: 32:

gggagc(F)aggagagaggu(F)c(F)agau(F)gggc(F)agc(F)ggaggau(F)ggc(F)gaagu(F)c(F)au(F)u(F)gggc(F)gc(F)c(F)u(F)au(F)gc(F)gu(F)gc(F)u(F)ggu(F)ggag

SEQ ID NO: 33:

25 gggagc(F)aggagagaggu(F)c(F)agau(F)ggaggagc(F)c(F)agu(F)gau(F)c(F)gu(F)u(F)gac(F)c(F)u(F)c(F)aa(F)gc(F)ac(F)c(F)u(F)au(F)gc(F)gu(F)gc(F)u(F)agu(F)gu(F)ga

SEQ ID NO: 34:

gggagc(F)aggagagaggu(F)c(F)agau(F)ggaggagac(F)agu(F)gau(F)c(F)gu(F)u(F)gac(F)c(F)c(F)ac(F)c(F)gggu(F)c(F)c(F)u(F)au(F)gc(F)gu(F)gc(F)u(F)agu(F)gu(F)ga

30 SEQ ID NO: 35:

gggagc(F)aggagagaggu(F)c(F)agau(F)ggaggaggc(F)agu(F)aa(F)c(F)gu(F)u(F)gac(F)u(F)ggu(F)aaac(F)c(F)c(F)c(F)u(F)au(F)gc(F)gu(F)gc(F)u(F)agu(F)gu(F)ga

SEQ ID NO: 36:

35 gggagc(F)aggagagaggu(F)c(F)agau(F)gu(F)au(F)agc(F)gaagu(F)c(F)au(F)u(F)gagc(F)gac(F)aaagc(F)c(F)ggc(F)c(F)u(F)au(F)gc(F)gu(F)gc(F)u(F)agu(F)gu(F)ga

Se evaluaron las actividades de unión de IL-17 de los ácidos nucleicos mostrados en las SEQ ID NO: 1-6 y 29-36 mediante método de resonancia de plasmones superficiales. Se tomaron las mediciones usando BIAcore 2000. Se usó el chip SA como chip sensor, que tenía estreptavidina inmovilizada en él. Unida a la misma había aproximadamente 600 RU de un Poly dT de 16 nucleótidos con biotina unida al extremo 5' del mismo. El ácido nucleico ligando tiene un Poly A de 16 nucleótidos añadida al extremo 3' del mismo, y estaba inmovilizado sobre el chip SA a través de un enlace entre dT y A. La cantidad inmovilizada era aproximadamente de 800 RU. Se inyectaron 20 µl de IL-17 humana para analito, preparada a 0,5 µM, con la adición tRNA a 0,1 mg/ml para disminuir la adsorción no específica. Se usó solución A como tampón de migración. Como resultado de la medida, se encontró que todos los ácidos nucleicos mostrados en las SEQ ID NO: 1-6 y 29-36 unían significativamente más IL-17 que el control negativo 30N. En este caso, 30N se refiere al grupo de ácido nucleico usado para la primera ronda de SELEX, que comprende una secuencia aleatoria de 30 nucleótidos. Como un ejemplo, se muestra en la Fig. 7 un sensograma que muestra un estado de unión del aptámero mostrado en la SEQ ID NO: 1 (Apt1) e IL-17 humana. De

lo anterior, se demuestra que los ácidos nucleicos mostrados en las SEQ ID NO: 1-6 y 29-36 son aptámeros que se unen a IL-17.

Se determinó mediante el método de resonancia plasmónica de superficie si los aptámeros de IL-17 mostrados en las SEQ ID NO: 1-6 y 29-36 se unían a IL-17F, que pertenece a la misma familia. La homología de secuencia de aminoácidos entre IL-17 e IL-17F es del 50%. Se realizó el experimento usando IL-17F producida por R&D Company (1335-INS/CF), aunque en una situación en donde se añadió tRNA para disminuir la adsorción inespecífica como se describió anteriormente. Como resultado, se encontró que ninguno de los aptámeros mostrados en las SEQ ID NO: 1-6 y 29-36 se une a IL-17F. Como un ejemplo, se muestra en la Fig. 8 un sensograma que muestra que el aptámero mostrado en la SEQ ID NO: 1 no se une a IL-17F humana. De lo anterior, se demuestra que los aptámeros mostrados en las SEQ ID NO: 1-6 y 29-36 se unen específicamente a IL-17.

Ejemplo 2: Acortamiento de los aptámeros mostrados en las SEQ ID NO: 1, 2, y 30

Se realizó el acortamiento de los aptámeros mostrados en las SEQ ID NO: 1, 2, y 30 para preparar los ácidos nucleicos mostrados en las SEQ ID NO: 37-44 mediante síntesis química. Se determinó si estos ácidos nucleicos poseen actividad de unión para IL-17 mediante el método de resonancia plasmónica de superficie de la misma manera que en el Ejemplo 1. Como resultado, se encontró que todos estos ácidos nucleicos poseían actividad de unión para IL-17. El aptámero mostrado en la SEQ ID NO: 40 comprende una secuencia común contenida en los aptámeros mostrados en las SEQ ID NO: 1, 2, y 29 (SEQ ID NO: 58), y tiene 23 nucleótidos de longitud. El aptámero mostrado en la SEQ ID NO: 44 comprende una secuencia común contenida en el aptámero mostrado en la SEQ ID NO: 30, y tiene 33 nucleótidos de longitud. El aptámero mostrado en la SEQ ID NO: 44 comprende una secuencia común de 8 nucleótidos contenida en las SEQ ID NO: 6-21, 30 y 31 (SEQ ID NO: 59) y una secuencia común de 16 nucleótidos contenida en las SEQ ID NO: 7, 9, 13, 21 y 30 (SEQ ID NO: 60). Las estructuras secundarias de los aptámeros mostrados en las SEQ ID NO: 40 y 44 como se predijeron usando el programa MFOLD se muestran en las Figs. 9 y 10, respectivamente. En la Fig. 9, se indica cada secuencia común mediante un círculo negro. En la Fig. 10, las bases de la secuencia que es común a las SEQ ID NO: 6-21, 30 y 31 están encerradas en cuadrados, y las bases de la secuencia que es común solamente a las SEQ ID NO: 7, 9, 13, 21 y 30 están marcadas con símbolos \* (asteriscos).

Se muestran a continuación las secuencias de nucleótidos respectivas.

SEQ ID NO: 37: Un aptámero de 54 nucleótidos de longitud que tiene una alteración del aptámero mostrado en la SEQ ID NO: 1

c(F)agau(F)gggc(F)agc(F)agaggau(F)agc(F)gaagu(F)c(F)au(F)u(F)gagc(F)gc(F)c(F)u(F)au(F)gc(F)gu(F)gc(F)u(F)agu(F)gu(F)g

SEQ ID NO: 38: Un aptámero de 40 nucleótidos de longitud que tiene una alteración del aptámero mostrado en la SEQ ID NO: 37

gc(F)agc(F)agaggau(F)agc(F)gaagu(F)c(F)au(F)u(F)gagc(F)gc(F)c(F)u(F)au(F)gc(F)gu(F)gc(F)

SEQ ID NO: 39: Un aptámero de 33 nucleótidos de longitud que tiene una alteración del aptámero mostrado en la SEQ ID NO: 38

gc(F)agaggau(F)agc(F)gaagu(F)c(F)au(F)u(F)gagc(F)gc(F)c(F)u(F)au(F)gc(F)

SEQ ID NO: 40: Un aptámero de 23 nucleótidos de longitud que tiene una alteración del aptámero mostrado en la SEQ ID NO: 39

ggau(F)agc(F)gaagu(F)c(F)au(F)u(F)gagc(F)gc(F)c(F)

SEQ ID NO: 41: Un aptámero de 27 nucleótidos de longitud que tiene una alteración del aptámero mostrado en la SEQ ID NO: 39

ggggau(F)agc(F)gaagu(F)c(F)au(F)u(F)gagc(F)gc(F)c(F)c(F)c(F)

SEQ ID NO: 42: Un aptámero de 41 nucleótidos de longitud que tiene una alteración del aptámero mostrado en la SEQ ID NO: 2

gu(F)gc(F)ac(F)au(F)gggau(F)agc(F)gaagu(F)c(F)au(F)u(F)gagc(F)gc(F)c(F)u(F)au(F)gc(F)gu(F)gc(F)

SEQ ID NO: 43: Un aptámero de 52 nucleótidos de longitud que tiene una alteración del aptámero mostrado en la SEQ ID NO: 30

agaggu(F)c(F)agau(F)ggu(F)c(F)u(F)agc(F)c(F)ggaggagu(F)c(F)agu(F)aa(F)c(F)ggu(F)agac(F)c(F)u(F)au(F)gc(F)gu(F)g

SEQ ID NO: 44: Un aptámero de 33 nucleótidos de longitud que tiene una alteración del aptámero mostrado en la SEQ ID NO: 30

ggu(F)c(F)u(F)agc(F)c(F)ggaggagu(F)c(F)agu(F)aa(F)c(F)ggu(F)agac(F)c(F)

Ejemplo 3: Preparación de mutantes del aptámero mostrado en la SEQ ID NO: 40

- 5 Se prepararon los mutantes mediante la inducción de una mutación al aptámero mostrado en la SEQ ID NO: 40, y se evaluaron sus actividades de unión para IL-17 mediante el método de resonancia plasmónica de superficie. Se muestran a continuación las secuencias y modificaciones de los mutantes.

SEQ ID NO: 45: Un aptámero preparado induciendo la mutación (u(F)16:c(F)16) al aptámero mostrado en la SEQ ID NO: 40

- 10 ggau(F)agc(F)gaagu(F)c(F)au(F)c(F)gagc(F)gc(F)c(F)

SEQ ID NO: 46: Un aptámero preparado induciendo la mutación (g21:a21) al aptámero mostrado en la SEQ ID NO: 40

ggau(F)agc(F)gaagu(F)c(F)au(F)u(F)gagc(F)ac(F)c(F)

- 15 SEQ ID NO: 47: Un aptámero preparado induciendo la mutación (c(F)7:a(M)7) al aptámero mostrado en la SEQ ID NO: 40

ggau(F)aga(F)gaagu(F)c(F)au(F)u(F)gagc(F)gc(F)c(F)

SEQ ID NO: 48: Un aptámero preparado induciendo la mutación (u(F)12:a(M)12) al aptámero mostrado en la SEQ ID NO: 40

ggau(F)agc(F)gaaga(F)c(F)au(F)u(F)gagc(F)gc(F)c(F)

- 20 SEQ ID NO: 40-2: Un aptámero preparado añadiendo la mutación una modificación OMe a la a3 del aptámero mostrado en la SEQ ID NO: 40

gga(F)u(F)agc(F)gaagu(F)c(F)au(F)u(F)gagc(F)gc(F)c(F)

SEQ ID NO: 40-3: Un aptámero preparado reemplazando la c(F)7 del aptámero mostrado en la SEQ ID NO: 40 con c(M)7

- 25 ggau(F)agc(F)gaagu(F)c(F)au(F)u(F)gagc(F)gc(F)c(F)

SEQ ID NO: 40-4: Un aptámero preparado añadiendo una modificación OMe a la g19 del aptámero mostrado en la SEQ ID NO: 40

ggau(F)agc(F)gaagu(F)c(F)au(F)u(F)gag(F)c(F)gc(F)c(F)

- 30 Todos estos aptámeros se unen a IL-17. Esto muestra que el aptámero mostrado en la SEQ ID NO: 40 retiene la actividad de unión para IL-17 incluso cuando se introducen varias mutaciones o se modifica el método de modificación.

Ejemplo 4: Aptámeros que inhiben la unión de IL-17 y el receptor de IL-17

Se determinó si los aptámeros mostrados en las SEQ ID NO: 1-6 y 29-44 inhibían la unión de IL-17 al receptor de IL-17 (IL-17R) usando el método de resonancia plasmónica de superficie.

- 35 Como se indica en el protocolo de la compañía BIAcore, se inmovilizó Proteína A (21181, PIERCE) sobre un chip sensor CM5. Aproximadamente 900 RU de IL-17R-Fc humana se fusionó con la porción Fc de la IgG (177-IR, R&D systems) se inmovilizaron sobre el mismo. Como analito, se alimentó una mezcla de IL-17 (0,11 μM) y cada aptámero (0,33 μM) después de dejar reposar durante 15 minutos. Si el aptámero inhibe la unión de IL-17 al IL-17R, no se espera que aumente la señal del sensograma; si el aptámero no inhibe la unión, se formará un complejo terciario y se espera que la señal aumente. Antes de comenzar el experimento de inhibición, se confirmó que IL-17 se unía al IL-17R. Para el control negativo, se usó una mezcla de IL-17 y 30N. 30N se refiere al grupo de ácido nucleico usado para la primera ronda de SELEX, que comprende una secuencia aleatoria de 30 nucleótidos. Como resultado del experimento, se encontró que todos los aptámeros mostrados en las SEQ ID NO: 1-6 y 29-44 inhibían la unión de IL-17 al IL-17R. Mientras, 30N no presentaba actividad inhibitoria. Como un ejemplo, se muestra un sensograma que muestra que el aptámero mostrado en la SEQ ID NO: 1 inhibe la unión de IL-17 al IL-17R en la Fig.11.
- 40
- 45

De lo anterior, se demostró que los aptámeros mostrados en las SEQ ID NO: 1-6 y 29-44 se pueden usar como inhibidores de IL-17.

Ejemplo 5: Preparación de mutantes del aptámero mostrado en la SEQ ID NO: 44

Se prepararon los mutantes induciendo una mutación al aptámero mostrado en la SEQ ID NO: 44; y se examinó si inhibían la unión de IL-17 al IL-17R usando el método de resonancia plasmónica de superficie de la misma manera que en Ejemplo 6. Las secuencias y modificaciones de los mutantes se muestran a continuación.

- 5 SEQ ID NO: 49: Un aptámero preparado induciendo una mutación de supresión de (g7) al aptámero mostrado en la SEQ ID NO: 44  
 ggu(F)c(F)u(F)ac(F)c(F)ggaggagu(F)c(F)agu(F)aau(F)c(F)ggu(F)agac(F)c(F)  
 SEQ ID NO: 50: Un aptámero preparado induciendo una mutación (g14:a14) al aptámero mostrado en la SEQ ID NO: 44
- 10 ggu(F)c(F)u(F)agc(F)c(F)ggagaagu(F)c(F)agu(F)aau(F)c(F)ggu(F)agac(F)c(F)  
 SEQ ID NO: 51: Un aptámero preparado induciendo una mutación (g20:a20) al aptámero mostrado en la SEQ ID NO: 44  
 ggu(F)c(F)u(F)agc(F)c(F)ggaggagu(F)c(F)aau(F)aau(F)c(F)ggu(F)agac(F)c(F)
- 15 SEQ ID NO: 52: Un aptámero preparado induciendo una mutación (g1g2u(F)3c(F)4:G1G2G3G4, g30a31c(F)32c(F)33:C30C31C32C33) al aptámero mostrado en la SEQ ID NO: 44. En este caso, cada letra mayúscula indica un deoxinucleótido.  
 GGGGu(F)agc(F)c(F)ggaggagu(F)c(F)agu(F)aau(F)c(F)ggu(F)aCCCC  
 SEQ ID NO: 44-1: Un aptámero preparado induciendo una mutación (a19g20:a(M)19g(M)20) al aptámero mostrado en la SEQ ID NO: 44
- 20 ggu(F)c(F)u(F)agc(F)c(F)ggaggagu(F)c(F)a(M)g(M)u(F)aau(F)c(F)ggu(F)agac(F)c(F)  
 SEQ ID NO: 44-2: Un aptámero preparado induciendo una mutación (a15g16:a(M)15g(M)16) al aptámero mostrado en la SEQ ID NO: 44  
 ggu(F)c(F)u(F)agc(F)c(F)ggagga(M)g(M)u(F)c(F)agu(F)aau(F)c(F)ggu(F)agac(F)c(F)
- 25 SEQ ID NO: 53: Un aptámero preparado suprimiendo (g27) en adelante del aptámero mostrado en la SEQ ID NO: 44  
 ggu(F)c(F)u(F)agc(F)c(F)ggaggagu(F)c(F)agu(F)aau(F)c(F)gg  
 SEQ ID NO: 54: Un aptámero preparado suprimiendo (g1g2u(F)3) y (a31c(F)32c(F)33) del aptámero mostrado en la SEQ ID NO: 44  
 c(F)u(F)agc(F)c(F)ggaggagu(F)c(F)agu(F)aau(F)c(F)ggu(F)ag
- 30 SEQ ID NO: 44-3: Un aptámero preparado introduciendo una mutación (a6g7:a(M)6g(M)7) dentro del aptámero mostrado en la SEQ ID NO: 44  
 ggu(F)c(F)u(F)a(M)g(M)c(F)c(F)ggaggagu(F)c(F)agu(F)aau(F)c(F)ggu(F)agac(F)c(F)  
 SEQ ID NO: 44-4: Un aptámero preparado introduciendo una mutación (g10g11:g(M)10g(M)11) dentro del aptámero mostrado en la SEQ ID NO: 44
- 35 ggu(F)c(F)u(F)agc(F)c(F)g(M)g(M)aggagu(F)c(F)agu(F)aau(F)c(F)ggu(F)agac(F)c(F)  
 SEQ ID NO: 44-5: Un aptámero preparado introduciendo una mutación (a12g13:a(M)12g(M)13) dentro del aptámero mostrado en la SEQ ID NO: 44  
 ggu(F)c(F)u(F)agc(F)c(F)gga(M)g(M)gagu(F)c(F)agu(F)aau(F)c(F)ggu(F)agac(F)c(F)
- 40 SEQ ID NO: 44-6: Un aptámero preparado introduciendo una mutación (g14a15:g(M)14a(M)15) dentro del aptámero mostrado en la SEQ ID NO: 44  
 ggu(F)c(F)u(F)agc(F)c(F)ggagg(M)a(M)gu(F)c(F)agu(F)aau(F)c(F)ggu(F)agac(F)c(F)  
 SEQ ID NO: 44-7: Un aptámero preparado introduciendo una mutación (a22a23:a(M)22a(M)23) dentro del aptámero mostrado en la SEQ ID NO: 44  
 ggu(F)c(F)u(F)agc(F)c(F)ggagga(M)gu(F)c(F)agu(F)a(M)a(M)a(M)u(F)c(F)ggu(F)agac(F)c(F)

SEQ ID NO: 44-8: Un aptámero preparado añadiendo PEG40 (SUNBRIGHT GL2-400GS2, producido por NOF Corporation Company) al extremo 5' terminal del aptámero mostrado en la SEQ ID NO: 44, y añadiendo idT (dT invertido) al extremo 3' del mismo.

PEG40-

5 ggu(F)c(F)u(F)agc(F)c(F)ggaggagu(F)c(F)agu(F)aau(F)c(F)ggu(F)agac(F)c(F)-idT

Todos estos aptámeros inhiben la unión de IL-17 al receptor de IL-17 (IL-17R). Esto demuestra que el aptámero mostrado en la SEQ ID NO: 44 retiene la actividad inhibitora frente a la unión de IL-17 al receptor de IL-17 (IL-17R) incluso después de que se introducen varias mutaciones o se modifica el método de modificación.

Ejemplo 6: Aptámeros inhiben la señalización de IL-17 en células cultivadas

10 Se determinó si el aptámero mostrado en la SEQ ID NO: 44 es capaz de inhibir la estimulación celular por IL-17 usando fibroblastos dérmicos humanos normales (NHDF, Sanko Junyaku). Cuando se estimulan con IL-17, las células NHDF producen interleucina 6 (IL-6) de modo extracelular. Cuando se estimularon las células NHDF con IL-17 humana (producida por Preprotech Company) a (40 ng/ml), se añadió un aptámero (el aptámero mostrado en la SEQ ID NO: 44) al medio, y se midió la IL-6 producida 24 horas más tarde mediante un método de ensayo  
15 inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA) (Endogen Human IL-6 ELISA Kit: Thermo scientific). Los resultados correspondientes a la inhibición de la producción de IL-6 se muestran en la Fig. 12. Como resultado de la medida, se confirmó que cuando se añade el aptámero, se suprime la producción de IL-6 de forma dependiente de la dosis. Se obtuvo un mayor efecto inhibitor que aquel de un anticuerpo neutralizante anti-IL-17 (MAB421, producido por R&D Systems). Mientras, el RNA no presentó actividad inhibitora. En este caso, el RNA control se refiere al grupo de ácido nucleico usado en la primera ronda de SELEX, que comprende una secuencia aleatoria de 30 nucleótidos.  
20 Estos hallazgos demuestran que el aptámero de la presente invención también posee alta actividad inhibitora frente a la señalización de IL-17 en células supervivientes.

25 Ejemplo 7: Experimento de supresión de la patogénesis en un modelo de ratón de EAE (Encefalomiелitis Autoinmune Experimental) inducida por aptámero

Se analizó la influencia del aptámero en la patogénesis usando el modelo murino EAE, que es conocido como un modelo de esclerosis múltiple humana. Se emulsionaron 300 µg péptido de glicoproteína de mielina de oligodendrocitos 35-55 (MOG<sub>35-55</sub>) (MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK) con adyuvante incompleto de Freund que contenía 500 µg de bacilo de tuberculosis (Mycobacterium tuberculosis), y esta emulsión se administró  
30 subcutáneamente a las regiones axilar y lumbar de ratones silvestres C57BL/6 (hembras, 8 semanas de edad) para sensibilizar a los animales. Además, inmediatamente después de la sensibilización y 48 horas más tarde, se disolvieron 200 ng de toxina de la tosferina en 200 µl de PBS y se administraron a la vena de la cola para inducir EAE. Después de eso se evaluaron cada día los síntomas clínicos usando el criterio que se muestra a continuación.

35 Para un grupo de ratones silvestres (n=10) y grupos de ratones que reciben el aptámero mostrado en las SEQ ID NO: 44-8 (n=10 para cada uno de 1 mg/kg, 3 mg/kg, y 10 mg/kg), se registraron las puntuaciones clínicas cada día y se evaluaron los síntomas clínicos. Los valores de las puntuaciones clínicas se calificaron como 0: ningún síntoma, 0,5: la cola medio caída, 1: la cola enteramente caída, 2: alteración de la marcha, 3: parálisis de un miembro, 4: parálisis de ambas extremidades traseras, 5: hemiplejia de extremidad anterior, 6: parálisis de extremidad anterior/muerte; las puntuaciones para todos los animales se registraron hasta el día 25 tras la administración de  
40 MOG<sub>35-55</sub>.

El aptámero mostrado en las SEQ ID NO: 44-8 se disolvió en solución salina fisiológica, y éste se administró 13 veces en total a intervalos de dos días desde el día de administración de MOG<sub>35-55</sub>. Se administró la misma cantidad de solución salina fisiológica de la misma forma para un grupo control.

45 La trayectoria temporal de la evaluación de los síntomas clínicos se muestra en la Fig. 13. Comparado con el grupo control, no se observó diferencia significativa en el grupo que recibió el aptámero mostrado en las SEQ ID NO: 44-8 a 1 mg/kg. Mientras, en los grupos que recibieron el aptámero mostrado en las SEQ ID NO: 44- 8 a 3 mg/kg y 10 mg/kg se observó mitigación de los síntomas clínicos con una diferencia estadísticamente significativa. Se analizaron diferencias estadísticamente significativas usando el test U de Mann-Whitney y el método de Dunnett. En la figura, se muestran diferencias estadísticamente significativas (\*: P<0,05, \*\*: P<0,01). Los resultados anteriores sugieren enérgicamente que los aptámeros frente a IL-17 se pueden utilizar como medicamentos terapéuticos para  
50 enfermedades autoinmunes como la esclerosis múltiple.

#### Aplicabilidad industrial

El aptámero o complejo de la presente invención o el complejo de la presente invención puede ser útil como fármaco o reactivo como un reactivo diagnóstico para enfermedades inflamatorias, y enfermedades como cáncer, alergia,

enfermedad infecciosa y similares. El aptámero o complejo de la presente invención también puede ser útil en la purificación y concentración de IL-17, marcaje de IL-17, y detección y cuantificación de IL-17.

**Listado de secuencias**

- <110> THE UNIVERSITY OF TOKYO
- 5 <120> Aptámero contra interleucina-17 y uso del mismo  
 <130> 091430  
 <150> JP2008-183233  
 <151> 2008-07-14  
 <160> 60
- 10 <170> PatentIn versión 3.3  
 <210> 1  
 <211> 72  
 <212> RNA  
 <213> Artificial
- 15 <220>  
 <223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra interleucina-17  
 <400> 1  
 gggagcagga gagaggucag augggcagca gaggauagcg aagucuuuga gcgccuauhc 60  
 gugcuagugu ga 72
- 20 <210> 2  
 <211> 72  
 <212> RNA  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra interleucina-17
- 25 <400> 2  
 gggagcagga gagaggucag auggugcaca ugggauagcg aagucuuuga gcgccuauhc 60  
 gugcuagugu ga 72  
 <210> 3  
 <211> 72  
 <212> RNA  
 <213> Artificial
- 30 <220>  
 <223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra interleucina-17  
 <400> 3  
 gggagcagga gagaggucag auguguaagg ucggaaguca ugaacggccc ggaccuauhc 60  
 gugcuagugu ga 72
- 35 <210> 4  
 <211> 72  
 <212> RNA  
 <213> Artificial  
 <220>
- 40 <223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra interleucina-17  
 <400> 4  
 gggagcagga gagaggucag augcuauagc gaagucuuug agcgagacau aggccuauhc 60  
 gugcuagugu ga 72

ES 2 602 119 T3

	<210> 5		
	<211> 72		
	<212> RNA		
	<213> Artificial		
5	<220>		
	<223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra interleucina-17		
	<400> 5		
	gggagcagga gagaggucag augagcgcca uaggguagag aagccauuga ucaccuaugc	60	
	gugcuagugu ga	72	
10	<210> 6		
	<211> 72		
	<212> RNA		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra interleucina-17		
15	<400> 6		
	gggagcagga gagaggucag auggugaugc auaggagugg agucagauau agcccuaugc	60	
	gugcuagugu ga	72	
20	<210> 7		
	<211> 72		
	<212> RNA		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra interleucina-17		
	<400> 7		
	gggagcagga gagaggucag auguguacgu uaggaggag gagucaguaa ucgccuaugc	60	
	gugcuagugu ga	72	
25	<210> 8		
	<211> 72		
	<212> RNA		
	<213> Artificial		
30	<220>		
	<223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra interleucina-17		
	<400> 8		
	gggagcagga gagaggucag auggaggagu cagcaaucgu uggccuucug cgaccuaugc	60	
	gugcuagugu ga	72	
35	<210> 9		
	<211> 72		
	<212> RNA		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra interleucina-17		
	<400> 9		
	gggagcagga gagaggucag auggaggagu caguaaucgu uggcccugcu ucaccuaugc	60	
40	gugcuagugu ga	72	
	<210> 10		
	<211> 72		
	<212> RNA		
	<213> Artificial		

## ES 2 602 119 T3

	<220>		
	<223>	ácido nucleico que tiene actividad de unión contra interleucina-17	
	<400>	10	
		gggagcagga gagaggucag auggaggagu cagugaucag ugaccucuug uggccuaugc	60
		<u>gugcuagugu ga</u>	<u>72</u>
5	<210>	11	
	<211>	72	
	<212>	RNA	
	<213>	Artificial	
	<220>		
10	<223>	ácido nucleico que tiene actividad de unión contra interleucina-17	
	<400>	11	
		gggagcagga gagaggucag auggaggagu cagugagcgu ugaccggcaa ucaccuaugc	60
		<u>gugcuagugu ga</u>	<u>72</u>
	<210>	12	
	<211>	72	
15	<212>	RNA	
	<213>	Artificial	
	<220>		
	<223>	ácido nucleico que tiene actividad de unión contra interleucina-17	
	<400>	12	
		gggagcagga gagaggucag auggaggagu cagugaucgu ugccggacuu gccccuaugc	60
20		<u>gugcuagugu ga</u>	<u>72</u>
	<210>	13	
	<211>	72	
	<212>	RNA	
	<213>	Artificial	
25	<220>		
	<223>	ácido nucleico que tiene actividad de unión contra interleucina-17	
	<400>	13	
		gggagcagga gagaggucag auggaggagu caguaaucgu ugaaccggag cauccuaugc	60
		<u>gugcuagugu ga</u>	<u>72</u>
	<210>	14	
30	<211>	72	
	<212>	RNA	
	<213>	Artificial	
	<220>		
	<223>	ácido nucleico que tiene actividad de unión contra interleucina-17	
35	<400>	14	
		gggagcagga gagaggucag augaugacag gagucagaua uaugcacauu ugaccuaugc	60
		<u>gugcuagugu ga</u>	<u>72</u>
	<210>	15	
	<211>	72	
	<212>	RNA	
40	<213>	Artificial	
	<220>		
	<223>	ácido nucleico que tiene actividad de unión contra interleucina-17	

ES 2 602 119 T3

	<400> 15		
	gggagcagga gagaggucag augguuaggu ggagucaggg aaaaaaccgu uugccuaugc	60	
	gugcuagugu ga	72	
	<210> 16		
	<211> 72		
5	<212> RNA		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra interleucina-17		
	<400> 16		
	gggagcagga gagaggucag auguagagug gagucagaua uagccuacaa gucccuaugc	60	
10	gugcuagugu ga	72	
	<210> 17		
	<211> 72		
	<212> RNA		
	<213> Artificial		
15	<220>		
	<223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra interleucina-17		
	<400> 17		
	gggagcagga gagaggucag auguaauagg ggagucagau auaccaacga agaccuaugc	60	
	gugcuagugu ga	72	
	<210> 18		
20	<211> 72		
	<212> RNA		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra interleucina-17		
25	<400> 18		
	gggagcagga gagaggucag auguaauagg ggagucagau auaccaacga agaccuaugc	60	
	gugcuagugu ga	72	
	<210> 19		
	<211> 72		
30	<212> RNA		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra interleucina-17		
	<400> 19		
	gggagcagga gagaggucag augcgauugc acgcgggggg ggagucagau auaccuaugc	60	
	gugcuagugu ga	72	
35	<210> 20		
	<211> 72		
	<212> RNA		
	<213> Artificial		
	<220>		
40	<223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra interleucina-17		
	<400> 20		
	gggagcagga gagaggucag augugauagu acgcggaagg ggagucagau auaccuaugc	60	
	gugcuagugu ga	72	

ES 2 602 119 T3

	<210> 21		
	<211> 72		
	<212> RNA		
	<213> Artificial		
5	<220>		
	<223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra interleucina-17		
	<400> 21		
	gggagcagga gagaggucag augcaaggag gagucaguaa ucgugacauu ggcccuaugc	60	
	gugcuagugu ga	72	
10	<210> 22		
	<211> 72		
	<212> RNA		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra interleucina-17		
15	<400> 22		
	gggagcagga gagaggucag augcuaugcc gcacaaacac guaugagugc ucaccuaugc	60	
	gugcuagugu ga	72	
20	<210> 23		
	<211> 72		
	<212> DNA		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra interleucina-17		
25	<400> 23		
	gggagcagga gagaggucag augguuacuu cccaaaaguc auaaaugggg uuaccuaugc	60	
	gugcuagugu ga	72	
30	<210> 24		
	<211> 72		
	<212> RNA		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra interleucina-17		
	<400> 24		
	gggagcagga gagaggucag auggaggaga caguaaucgu ugaccgcuuc gugccuaugc	60	
	gugcuagugu ga	72	
35	<210> 25		
	<211> 72		
	<212> RNA		
	<213> Artificial		
	<220>		
40	<223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra interleucina-17		
	<400> 25		
	gggagcagga gagaggucag augugauagc gaaggcauug agcgcacauu aaaccuaugc	60	
	gugcuagugu ga	72	
45	<210> 26		
	<211> 71		
	<212> RNA		
	<213> Artificial		

ES 2 602 119 T3

<220>  
 <223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra interleucina-17

<400> 26  
 gggagcagga gagaggucag augggcagca gaggaugcga agucaugag cgccuaugcg 60  
 ugcuaugug a 71

5 <210> 27  
 <211> 72  
 <212> RNA  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra interleucina-17

10 <400> 27  
 gggagcagga gagaggucag augccuggua ggcguagaga agucaugau cagccuaugc 60  
 gugcuagugu ga 72

<210> 28  
 <211> 72  
 <212> RNA  
 <213> Artificial

15 <220>  
 <223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra interleucina-17

<400> 28  
 gggagcagga gagaggucag auguuuaaaa agcuuaagug cugucaacuu cuaccuaugc 60  
 gugcuagugu ga 72

20 <210> 29  
 <211> 72  
 <212> RNA  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra interleucina-17

25 <400> 29  
 gggagcagga gagaggucag augcgauagc gaagucauug agcgcguguc caaccuaugc 60  
 gugcuagugu ga 72

<210> 30  
 <211> 72  
 <212> RNA  
 <213> Artificial

30 <220>  
 <223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra interleucina-17

<400> 30  
 gggagcagga gagaggucag auggucuagc cggaggaguc aguaaucggu agaccuaugc 60  
 gugcuagugu ga 72

<210> 31  
 <211> 72  
 <212> RNA  
 <213> Artificial

40 <220>  
 <223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra interleucina-17

ES 2 602 119 T3

	<400> 31	
	gggagcagga gagaggucag auggaagugg agucagauau agcaauuuu ugaccuaugc	60
	gugcuagugu ga	72
	<210> 32	
5	<211> 72	
	<212> RNA	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra interleucina-17	
	<400> 32	
	gggagcagga gagaggucag augggcagcg gaggauggcg aagucauugg gcgccuaugc	60
10	gugcuggugg ag	72
	<210> 33	
	<211> 72	
	<212> RNA	
	<213> Artificial	
15	<220>	
	<223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra interleucina-17	
	<400> 33	
	gggagcagga gagaggucag auggaggagc cagugaucgu ugaccucaau gcaccuaugc	60
	gugcuagugu ga	72
	<210> 34	
20	<211> 72	
	<212> RNA	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra interleucina-17	
25	<400> 34	
	gggagcagga gagaggucag auggaggaga cagugaucgu ugaccaccg gguccuaugc	60
	gugcuagugu ga	72
	<210> 35	
	<211> 72	
30	<212> RNA	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra interleucina-17	
	<400> 35	
	gggagcagga gagaggucag auggaggagg caguaaucgu ugacugguaa accccuaugc	60
	gugcuagugu ga	72
35	<210> 36	
	<211> 72	
	<212> RNA	
	<213> Artificial	
	<220>	
40	<223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra interleucina-17	
	<400> 36	
	gggagcagga gagaggucag auguauagcg aagucauuga gcgacaaagc cggccuaugc	60
	gugcuagugu ga	72

# ES 2 602 119 T3

- <210> 37  
<211> 54  
<212> RNA  
<213> Artificial
- 5 <220>  
<223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra interleucina-17  
  
<400> 37  
cagaugggca gcagaggaua gcgaagucan ugagcgccua ugcgugcuag ugug 54
- 10 <210> 38  
<211> 40  
<212> RNA  
<213> Artificial  
  
<220>  
<223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra interleucina-17
- 15 <400> 38  
gcagcagagg auagcgaagu cauugagcgc cuaugcgugc 40  
  
<210> 39  
<211> 33  
<212> RNA  
20 <213> Artificial  
  
<220>  
<223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra interleucina-17  
  
<400> 39  
gcagaggaua gcgaagucan ugagcgccua ugc 33
- 25 <210> 40  
<211> 23  
<212> RNA  
<213> Artificial  
  
<220>  
30 <223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra interleucina-17  
  
<400> 40  
ggauagcgaa gucaugagc gcc 23  
  
<210> 41  
<211> 27  
35 <212> RNA  
<213> Artificial  
  
<220>  
<223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra interleucina-17
- 40 <400> 41  
ggggauagcg aagucanuga gcgcccc 27  
  
<210> 42  
<211> 41  
<212> RNA  
<213> Artificial
- 45 <220>  
<223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra interleucina-17  
  
<400> 42  
gugcacaugg gauagcgaag ucauugagcg ccuugcgug c 41
- 50 <210> 43  
<211> 52

<212> RNA  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra interleucina-17  
  
 5 <400> 43  
 agaggucaga uggucuagcc ggaggaguca guaaucggua gaccuaugcg ug 52  
  
 <210> 44  
 <211> 33  
 <212> RNA  
 10 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra interleucina-17  
  
 <400> 44  
 ggucuagccg gaggagucag uaaucgguag acc 33  
  
 15 <210> 45  
 <211> 23  
 <212> RNA  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 20 <223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra interleucina-17  
  
 <400> 45  
 ggauagcgaa gucaucgagc gcc 23  
  
 <210> 46  
 <211> 23  
 25 <212> RNA  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra interleucina-17  
  
 <400> 46  
 30 ggauagcgaa gucauugagc acc 23  
  
 <210> 47  
 <211> 23  
 <212> RNA  
 <213> Artificial  
  
 35 <220>  
 <223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra interleucina-17  
  
 <400> 47  
 ggauagagaa gucauugagc gcc 23  
  
 <210> 48  
 <211> 23  
 40 <212> RNA  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra interleucina-17  
  
 45 <400> 48  
 ggauagcgaa gacauugagc gcc 23  
  
 <210> 49  
 <211> 32  
 <212> RNA  
 50 <213> Artificial

ES 2 602 119 T3

<220>  
<223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra interleucina-17

<400> 49  
ggucuaccgg aggagucagu aaucgguaga cc 32

5 <210> 50  
<211> 33  
<212> RNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra interleucina-17

10 <400> 50  
ggucuagccg gagaagucag uaucgguag acc 33

<210> 51  
<211> 33  
15 <212> RNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra interleucina-17

20 <400> 51  
ggucuagccg gaggagucaa uaucgguag acc 33

<210> 52  
<211> 33  
<212> RNA  
<213> Artificial

25 <220>  
<223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra interleucina-17

<400> 52  
gggguagccg gaggagucag uaucgguac ccc 33

30 <210> 53  
<211> 27  
<212> RNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra interleucina-17

35 <400> 53  
ggucuagccg gaggagucag uaucgg 27

<210> 54  
<211> 27  
<212> RNA  
40 <213> Artificial

<220>  
<223> ácido nucleico que tiene actividad de unión contra interleucina-17

<400> 54  
cuagccggag gagucaguaa ucgguag 27

45 <210> 55  
<211> 72  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
50 <223> DNA molde

# ES 2 602 119 T3

```

<220>
<221> característica_misc
<222> (20)..(49)
<223> n es a, c, g, o t

5 <400> 55
tcacactagc acgcataggn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnc atctgacctc 60

tctcctgctc cc 72

<210> 56
<211> 40
<212> DNA
10 <213> Artificial

<220>
<223> iniciador

<400> 56
taatacgact cactataggg agcaggagag aggtcagatg 40

15 <210> 57
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
20 <223> iniciador

<400> 57
tcacactagc acgcatagg 19

<210> 58
<211> 21
25 <212> RNA
<213> Artificial

<220>
<223> consensus sequence

<400> 58
30 gauagcgaag ucauugagcg c 21

<210> 59
<211> 8
<212> RNA
<213> Artificial

35 <220>
<223> secuencia sentido

<400> 59
ggagucag 8

<210> 60
40 <211> 16
<212> RNA
<213> Artificial

<220>
<223> secuencia sentido

45 <400> 60
ggaggaguca guaauc 16

```

## REIVINDICACIONES

1. Un aptámero que se une a IL-17 y/o inhibe la unión de IL-17 y el receptor de IL-17, en donde:
  - (a) el aptámero comprende una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59 o SEQ ID NO: 60;
  - 5 (b) el aptámero comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada de entre las SEQ ID NO: 3 a 5, 22 a 28, 32 a 36, 45 a 48, 50 y 51 (con la condición de que el uracilo puede ser timina); o
  - (c) el aptámero comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada de entre las SEQ ID NO: 3 a 5, 22 a 28, 32 a 36, 45 a 48, 50 y 51 (con la condición de que el uracilo puede ser timina) en donde se sustituyen, suprimen, insertan o añaden uno de cinco nucleótidos,
  - 10 y cada grupo hidroxilo en la posición 2' de la ribosa de los nucleótidos contenidos en el aptámero (a) – (c) anteriores está independientemente sin sustituir o sustituido con un átomo o un grupo seleccionado del grupo que consiste en un átomo de hidrógeno, un grupo metoxi y un átomo de flúor.
2. El aptámero según la reivindicación 1, en donde el aptámero no inhibe la unión de IL-17F y el receptor de IL-17.
3. El aptámero según la reivindicación 1, en donde el nucleótido de pirimidina es un nucleótido modificado.
- 15 4. El aptámero según la reivindicación 1, en donde:
  - (a) el aptámero comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada de entre las SEQ ID NO: 1, 2, 6 a 21, 29 a 31, 37 a 44, 49 y 52 a 54 (con la condición de que el uracilo puede ser timina), en donde los nucleótidos contenidos en el aptámero son tales que,
    - 20 (i) cada posición 2' de la ribosa del nucleótido de pirimidina es la misma o diferente y hay un átomo de flúor o está sustituida por un átomo o un grupo seleccionado del grupo que consiste en un átomo de hidrógeno, un grupo hidroxilo y un grupo metoxi, y
    - (ii) cada posición 2' de la ribosa del nucleótido de pirimidina es la misma o diferente y hay un grupo hidroxilo o está sustituida por un átomo o un grupo seleccionado del grupo que consiste en un átomo de hidrógeno, un grupo metoxi y un átomo de flúor; o
  - 25 (b) el aptámero comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada de entre las SEQ ID NO: 1, 2, 6 a 21, 29 a 31, 37 a 44, 49 y 52 a 54 (con la condición de que el uracilo puede ser timina), en donde se sustituyen, suprimen, insertan o añaden uno de cinco nucleótidos, en donde los nucleótidos contenidos en el aptámero son tales que,
    - 30 (i) cada posición 2' de la ribosa del nucleótido de pirimidina es la misma o diferente y hay un átomo de flúor o está sustituida por un átomo o un grupo seleccionado del grupo que consiste en un átomo de hidrógeno, un grupo hidroxilo y un grupo metoxi, y
    - (ii) cada posición 2' de la ribosa del nucleótido de pirimidina es la misma o diferente y hay un grupo hidroxilo o está sustituida por un átomo o un grupo seleccionado del grupo que consiste en un átomo de hidrógeno, un grupo metoxi y un átomo de flúor.
- 35 5. El aptámero según la reivindicación 4, en donde el aptámero comprende la secuencia de SEQ ID NO: 40 o 44.
6. El aptámero según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde un nucleótido contenido en el aptámero está modificado.
7. Un complejo que comprende un aptámero según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 y una sustancia funcional.
- 40 8. El complejo según la reivindicación 7, en donde la sustancia funcional es una sustancia de afinidad, o una sustancia para marcaje, una enzima, un vehículo de administración de medicamento o un medicamento.
9. Un producto farmacéutico que comprende un aptámero según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o el complejo según la reivindicación 7 u 8.
- 45 10. Un producto farmacéutico para usar en un método de tratamiento o de prevención de una enfermedad autoinmune, un cáncer, una alergia, u otra enfermedad asociada con inflamación, que comprende el aptámero según cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 6 o el complejo según la reivindicación 7 u 8.
11. Un reactivo diagnóstico que comprende un aptámero de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o el complejo según la reivindicación 7 u 8.

- 12.** Una sonda de detección de IL-17A que comprende un aptámero según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o el complejo según la reivindicación 7 u 8.
- 13.** Un portador de fase sólida para purificación de IL-17A que comprende un aptámero según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o el complejo según la reivindicación 7 u 8.
- 5 **14.** Un método de detección o purificación de IL-17A, que comprende el usos de un aptámero según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o el complejo según la reivindicación 7 u 8.

Figura 1

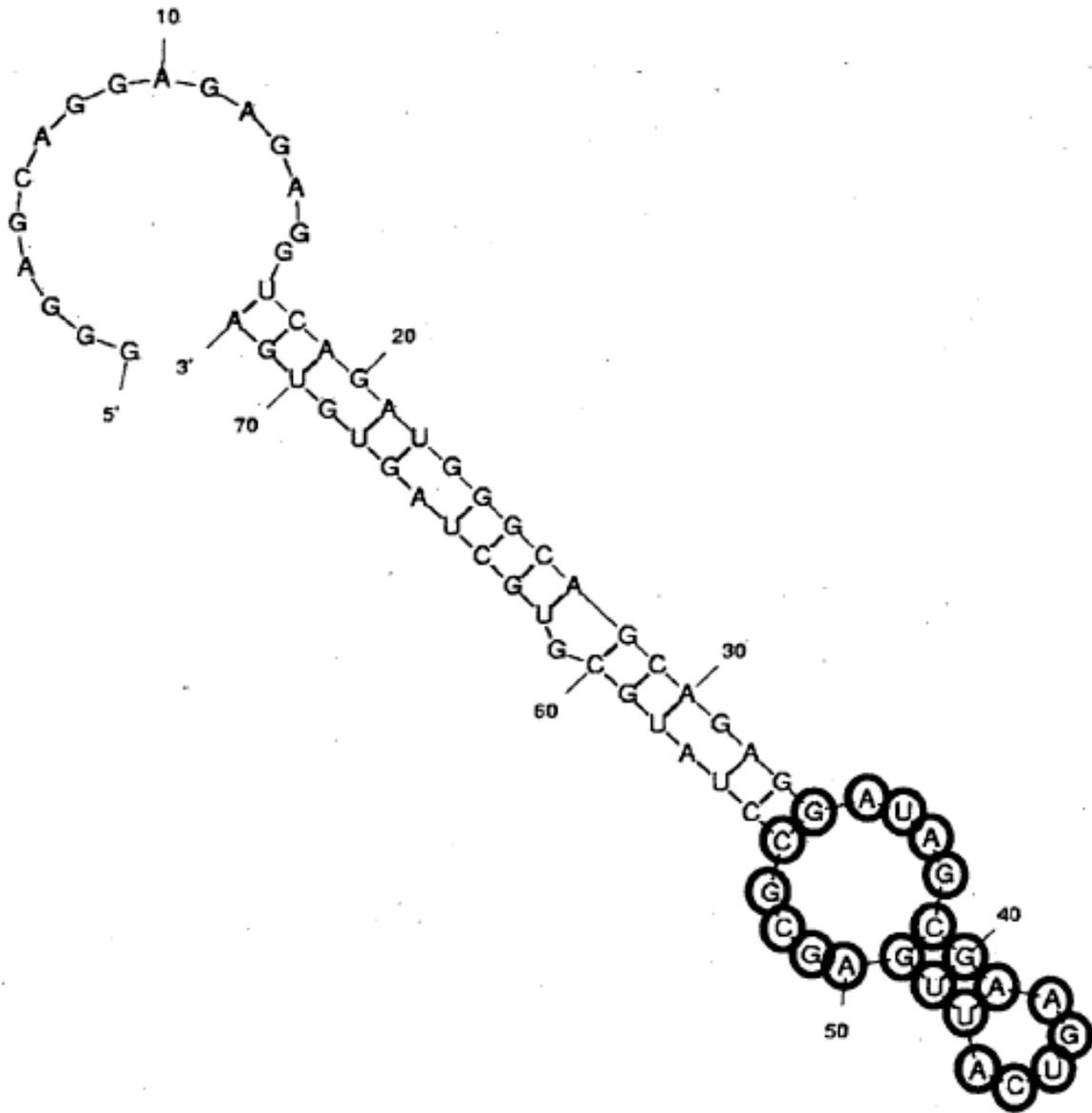


Figura 2

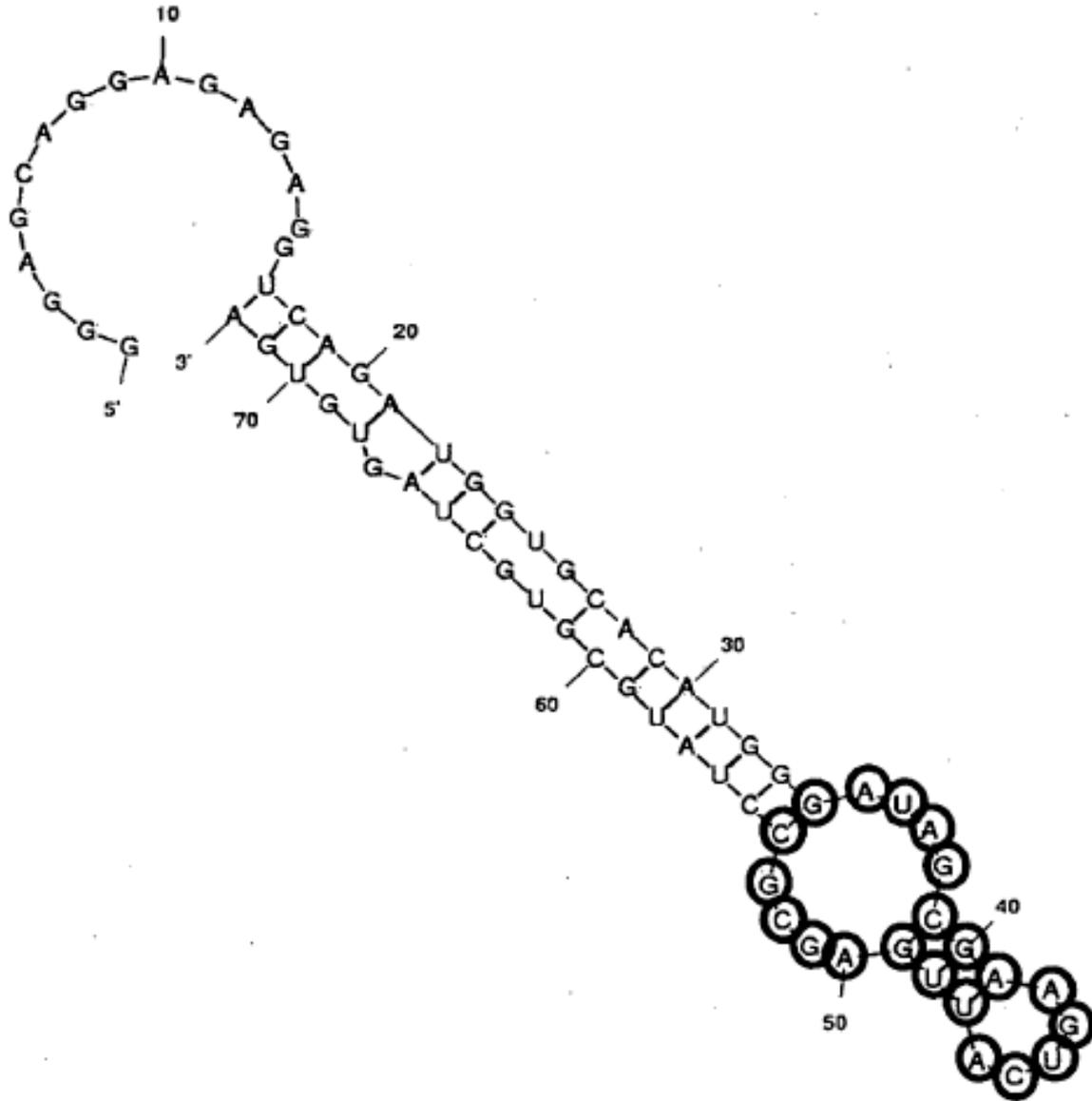


Figura 3

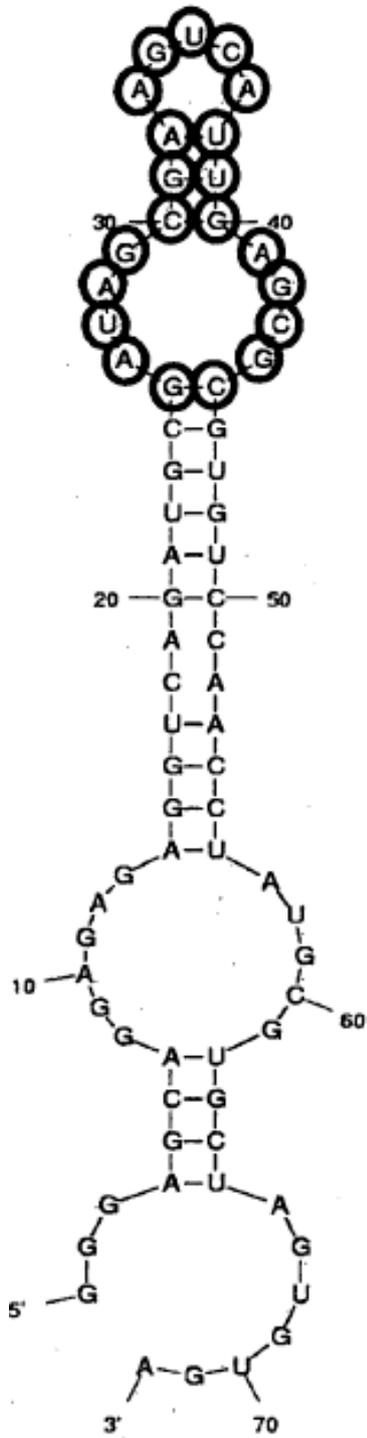




Figura 5

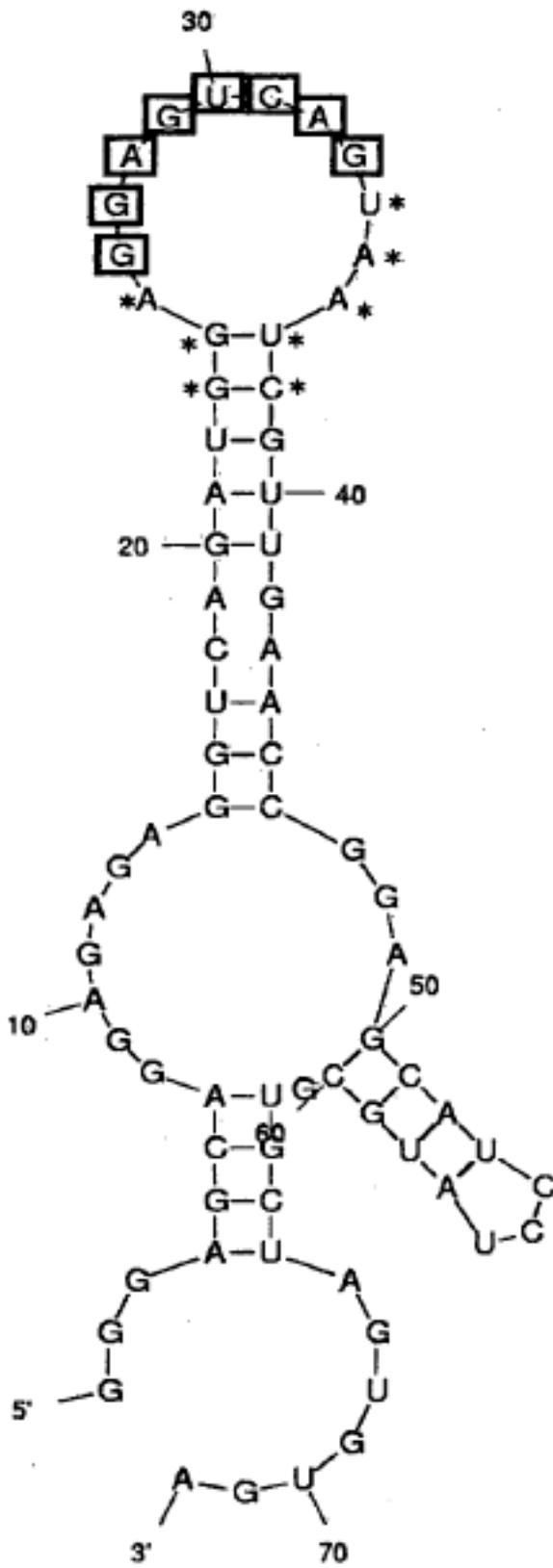


Figura 6

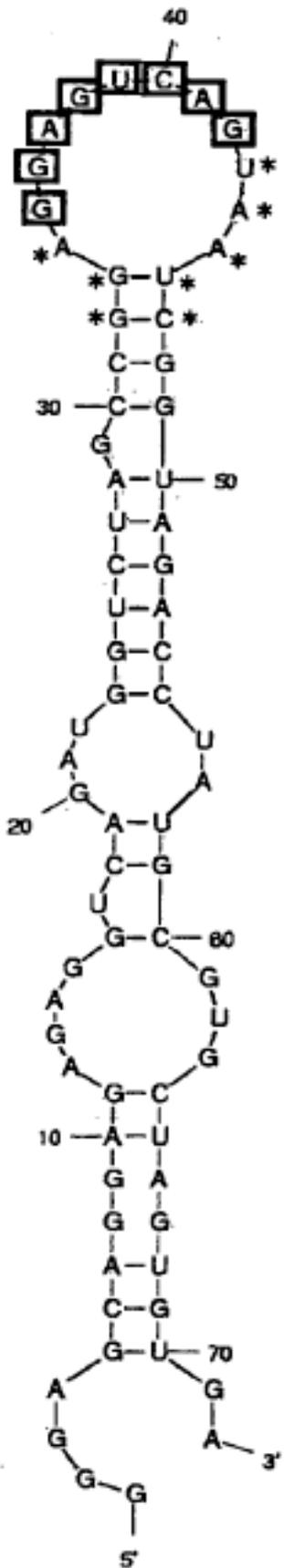


Figura 7

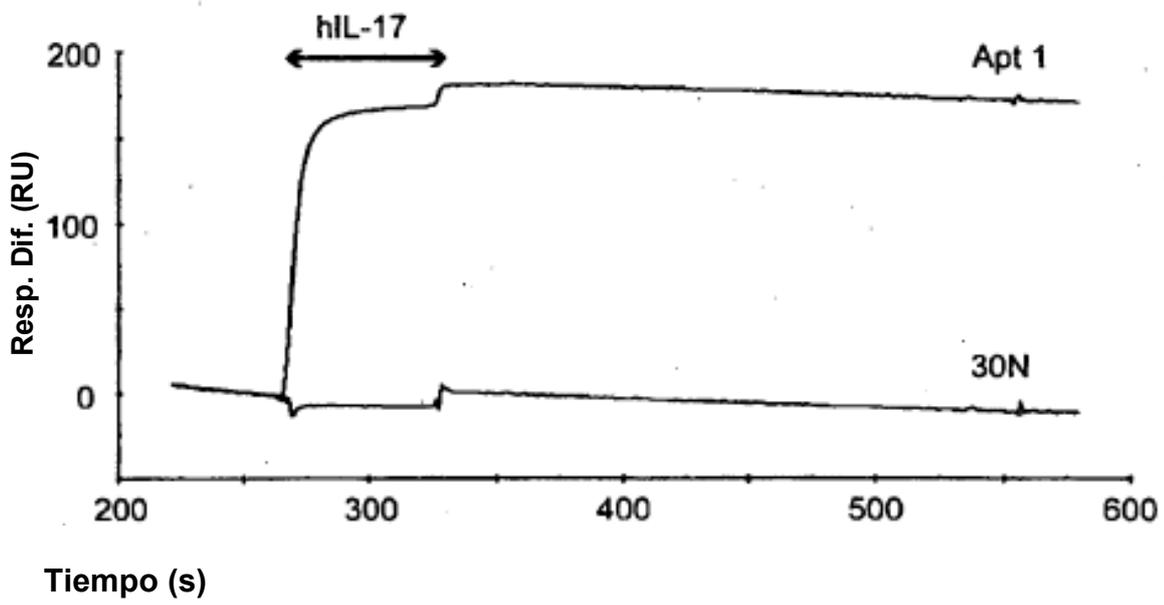


Figura 8

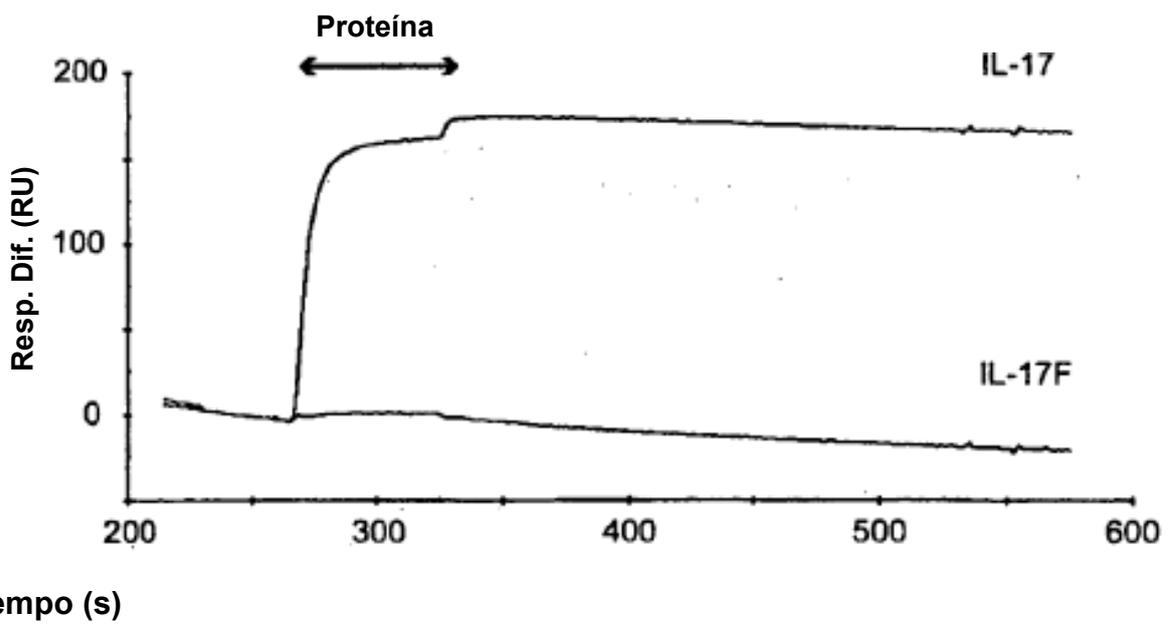


Figura 9

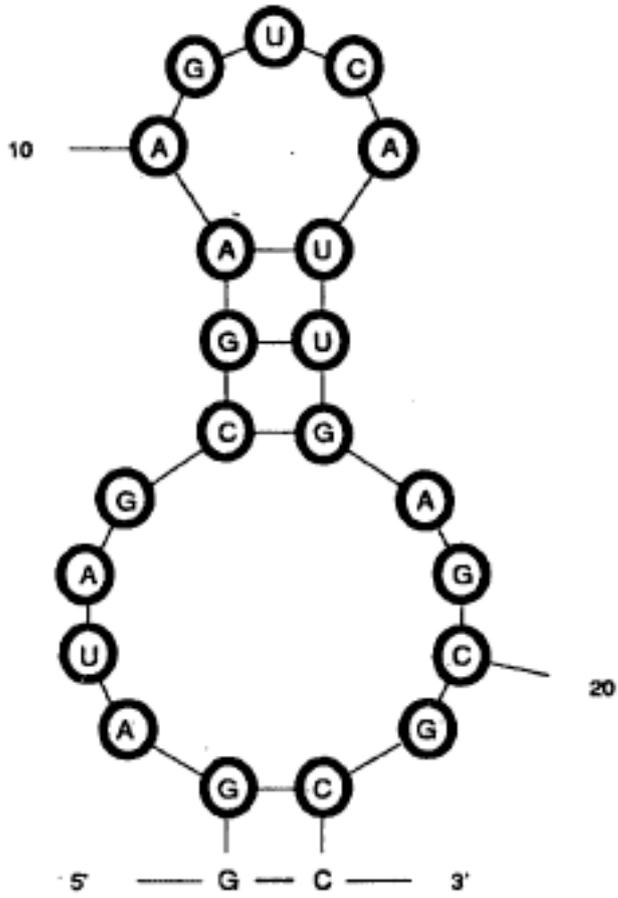




Figura 11

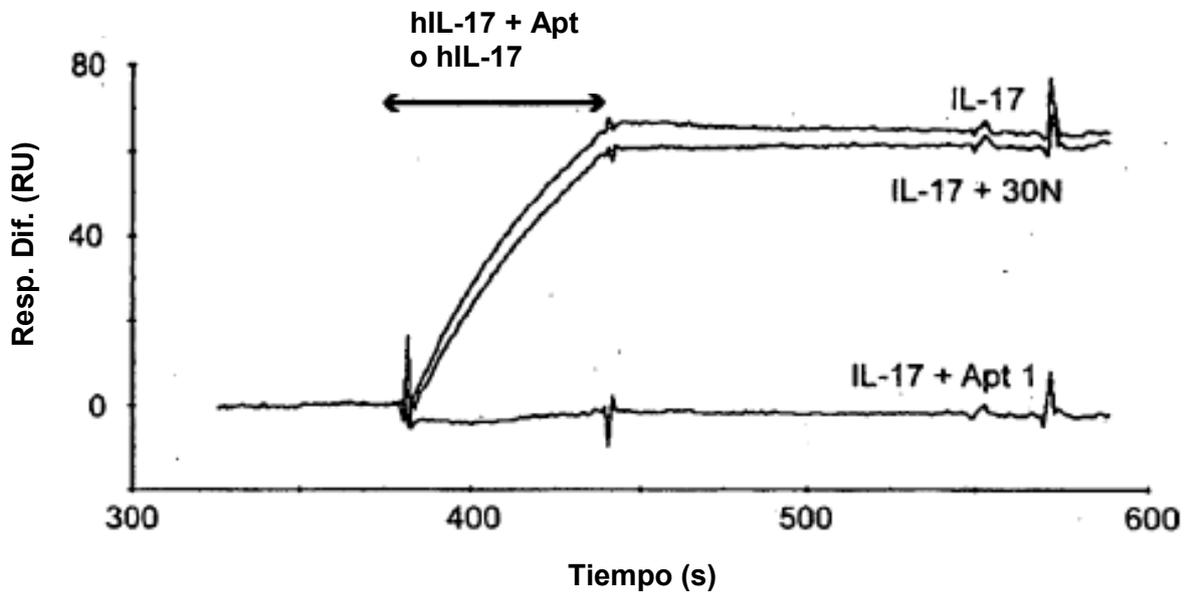


Figura 12

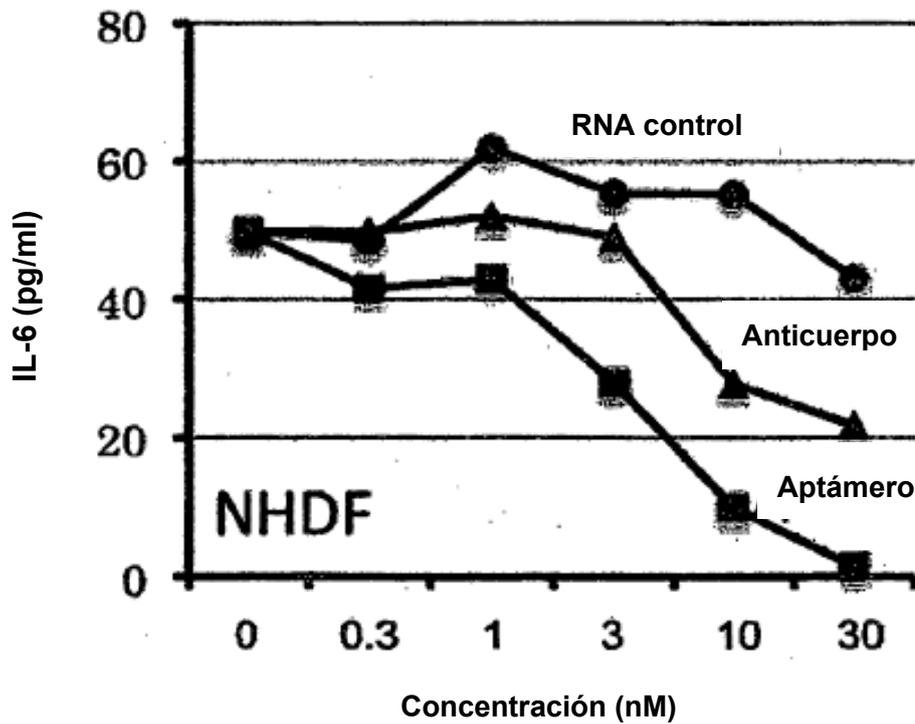
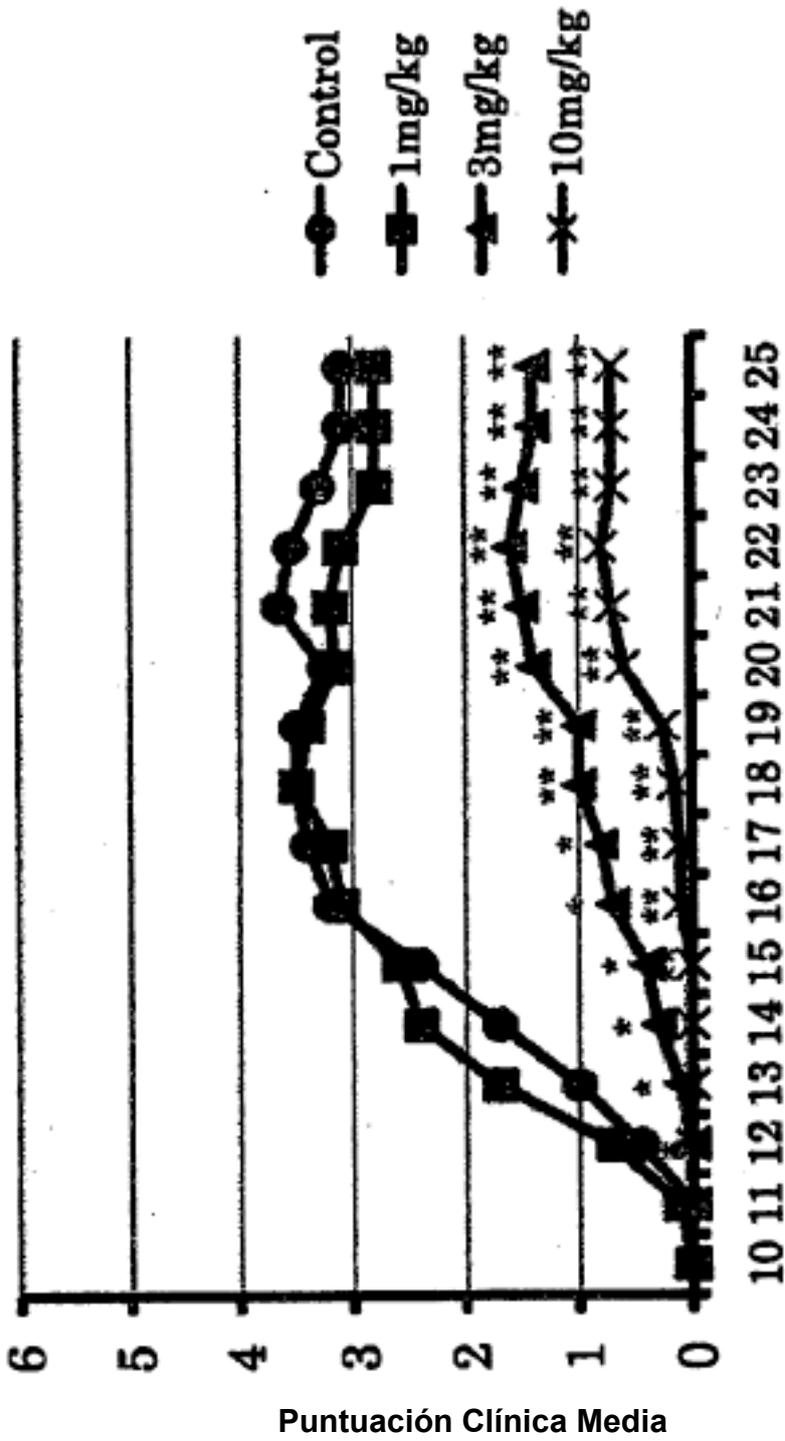


Figura 13



Días tras inmunización con MOG