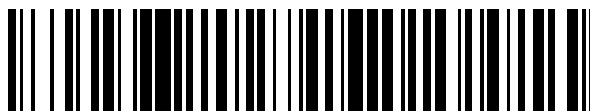


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 610 159**

51 Int. Cl.:

C07H 19/073 (2006.01)

C07H 19/10 (2006.01)

C07H 21/04 (2006.01)

C12N 15/115 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.04.2011 PCT/US2011/032017**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.10.2011 WO11130195**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.04.2011 E 11769393 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.10.2016 EP 2558586**

54 Título: **Aptámeros para β -NGF y su uso en el tratamiento de enfermedades y trastornos mediados por β -NGF**

30 Prioridad:

12.04.2010 US 323145 P

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

26.04.2017

73 Titular/es:

**SOMALOGIC, INC. (50.0%)
2945 Wilderness Place
Boulder, CO 80301, US y
OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LIMITED
(50.0%)**

72 Inventor/es:

**SCHNEIDER, DANIEL, J.;
HISAMINATO, AKIHIKO;
WAUGH, SHEELA;
RESNICOW, DANIEL;
NAGABUKURO, AKIRA y
ONO, TOSHIHIDE**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 610 159 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

Aptámeros para β -NGF y su uso en el tratamiento de enfermedades y trastornos mediados por β -NGF

5 **Campo de la invención**

La presente divulgación se refiere en general al campo de los ácidos nucleicos y más particularmente a aptámeros capaces de unirse con el factor de crecimiento nervioso, más específicamente con la subunidad β del factor de crecimiento nervioso (" β -NGF"), y que son útiles como agentes terapéuticos para prevenir, tratar o mejorar el prurito, las afecciones pruríticas y/u otras enfermedades o afecciones en las que está implicado el β -NGF. La divulgación se refiere además a materiales y métodos para la administración de los aptámeros capaces de unirse a β -NGF.

Antecedentes

15 La siguiente descripción proporciona un sumario de información relevante para la presente divulgación y no es una admisión de que cualquier información proporcionada o las publicaciones a las que se hace referencia en el presente documento sea una técnica anterior a la presente divulgación.

20 El picor grave tiene un impacto negativo sobre la calidad de vida de millones de personas cada día. El picor grave puede asociarse con varias afecciones de la salud, que incluye las afecciones pruríticas de la piel, tales como sarna, eccema, xerosis, psoriasis y urticaria, así como afecciones sistémicas, que incluyen la enfermedad hepática crónica o renal y en linfoma. De manera similar, el dolor es un caso común, siendo una de las razones principales para visitar al médico. El dolor se puede asociar a numerosos tipos de lesiones o afecciones, y el fallo para tratar el dolor agudo puede dar lugar a problemas de dolor crónico, así como trastornos metabólicos e inmunitarios. Además, la reducción de la calidad de vida del individuo que sufre prurito y/o dolor, tiene un impacto significativo sobre el presupuesto sanitario, particularmente en relación con las afecciones pruríticas de la piel, así como los trastornos con dolor crónico. Los esfuerzos actuales para manejar o tratar el prurito y/o dolor se reconocen ampliamente que son inadecuados.

30 La investigación neurofisiológica ha confirmado la distinción de las rutas del picor en comparación con las del dolor. La sensación de picor se percibe y transmite por neuronas C dedicadas que son distintas de los nociceptores que procesan la sensación dolorosa (Schmelz, Neurosci. Biobehav. Rev. doi: 10.1016/j.neubiorev. 2008.12.004, 2009). Las neuronas C dedicadas transmiten entonces el estímulo del picor a una clase especializada de neuronas del cuerno dorsal que lo proyectan al tálamo (Stander y Schmelz, Eur. J. Pain 10:473, 2006). Se cree que no hay un receptor especial para el picor en las terminaciones nerviosas periféricas y la especificidad de las neuronas C del picor se basa en sus conexiones especiales con la ruta del picor. Se han observado diferencias en los patrones de activación cerebral entre el picor y el dolor, tal como una ausencia de activación detectable del córtex talámico y somatosensorial del lóbulo parietal a partir de la sensación de picor (Yosipovitch et al., Lancet 361:690, 2003).

40 El dolor se clasifica en general como agudo o crónico. El dolor agudo es habitualmente una respuesta a un daño tisular que se caracteriza por una vida corta y se resuelve cuando el daño inicial se cura. El dolor crónico es persistente y puede no tener una asociación aparente con un evento traumático. El dolor puede clasificarse además basándose en el mecanismo de origen del dolor e incluye el nociceptivo y el no nociceptivo. El dolor nociceptivo está mediado por receptores específicos (receptores nociceptivos) que se activan por estímulos específicos (lesiones, inflamación, químicos, etc.). El dolor nociceptivo se puede clasificar adicionalmente como somático o visceral. El dolor somático se produce en tejidos tales como la piel, músculos, articulaciones, huesos o ligamentos. El dolor somático generalmente es punzante y localizado. Los tratamientos actuales incluyen el uso de opioides y fármacos anti-inflamatorios no esteroideos (AINES). El dolor visceral se produce en órganos internos. Frecuentemente es un dolor menos localizado y se trata generalmente con opioides.

50 El dolor no nociceptivo se puede dividir adicionalmente en neuropático o simpático. El dolor neuropático puede aparecer en el sistema nervioso central o periférico. El dolor neuropático se puede asociar a afecciones degenerativas, inflamación, o enfermedades infecciosas. Este tipo de dolor da como resultado hipersensibilidad (hiperalgesia) y frecuentemente se describe como un pinchazo o quemazón. Las opciones de tratamiento incluyen antagonistas de la N-metil-S-aspartato (NMDA), anti-arritmicos, anticonvulsivos, o anti-depresivos. El dolor neuropático frecuentemente es resistente a los analgésicos convencionales. El dolor simpático aparece en el sistema nervioso simpático así como en los sistemas nervioso central y periférico y generalmente se asocia a algún tipo de lesión. El sitio de la lesión puede presentar un aumento de hipersensibilidad y temperatura anormal. El tratamiento implica en general un régimen multi-fármaco que incluye bloqueo de nervios simpáticos, vasodilatación, anticonvulsivos, anti-arritmicos, y antidepresivos.

65 El tratamiento prolongado y de rutina del dolor con analgésicos opioides no está recomendado por el problema potencial de adicción, efectos secundarios, tolerancia, y dependencia del opioide. Los efectos secundarios del opioide pueden incluir náuseas, vómitos, estreñimiento, depresión respiratoria, etc. Con muchos tratamientos actuales se produce una falta de eficacia, graves efectos secundarios, e incapacidad de métodos de suministro farmacológico para ayudar al control adecuado del dolor. Estos problemas apoyan la necesidad de mejores agentes

terapéuticos para controlar el dolor.

5 Aunque el picor y el dolor son sensaciones claramente distintas, existen importantes interacciones entre picor y dolor. Se sabe bien que el picor se puede reducir por la sensación dolorosa que produce el rascado. Incluso, los analgésicos, tales como los opioides, actuando para disminuir sensaciones dolorosas, pueden a la vez aumentar la sensación de picor. Por lo tanto, algunos agentes terapéuticos para el dolor pueden exacerbar los síntomas de picor apoyando adicionalmente la necesidad de mejores agentes terapéuticos con potencial para tratar tanto el picor como el dolor.

10 El factor de crecimiento nervioso (NGF) es uno de una familia de citocinas neurotróficas o neurotrofinas. Las neurotrofinas tienen un papel clave en el desarrollo y mantenimiento tanto del sistema nervioso central como periférico controlando la supervivencia celular, diferenciación, y apoptosis. Además de estas funciones sobre el sistema nervioso, el NGF ha demostrado que aumenta la liberación de histamina, la producción de mastocitos, y el crecimiento y diferenciación de linfocitos B. El NGF ha demostrado también que modula la producción basófila de ciertos mediadores lipídicos. La apoptosis de neutrófilos también puede suprimirse por el NGF. Todos estos factores sugieren un papel del NGF en el sistema inmunitario así como en el sistema nervioso.

20 La cadena beta del NGF (β -NGF) solamente es responsable de la actividad estimulante del crecimiento nervioso del NGF. En la célula, el β -NGF existe como un dímero y se une a dos tipos de receptores de superficie celular en las células neuronales y no neuronales. La estructura terciaria de la proteína se basa en tres disulfuros cistina y dos cadenas β antiparalelas. La homología de aminoácidos de las proteínas humanas, de ratón y rata es aproximadamente del 90 %. La β -NGF como otras neurotrofinas, se une al receptor celular p75 con afinidad nM. La β -NGF también se une a uno de los receptores de la tirosina cinasa (Trk) en particular, TrkA, con afinidad pM. La reacción con el receptor p75 puede inducir la muerte celular mientras que la unión a TrkA promueve la supervivencia celular. La unión de β -NGF a TrkA da lugar a la fosforilación del receptor y proteínas celulares internas. La β -NGF se internaliza por endocitosis mediada por el receptor. Los receptores Trk se encuentran en un amplio intervalo de tejidos no neuronales.

30 El factor de crecimiento nervioso (NGF) que se libera de los queratinocitos en la piel es uno de los principales mediadores que aumentan la densidad nervios dérmica y que afecta a la morfología por, entre otras cosas, la promoción de brotes de fibras nerviosas (Schmelz, Neurosci. Biobehav. Rev. *ido:10.1016/j. neubiorev.* 2008.12.004, 2009). Se ha descubierto que los pacientes con prurito crónico presentan un aumento de la densidad de fibras nerviosas intradérmicas. Además, se ha descubierto que el NGF aumenta la sensibilidad de las neuronas periféricas, entre otras cosas, desencadenando el receptor de NGF, TrkA tirosina cinasa (Stander y Schmelz, Eur. J. Pain 10:473, 2006).

40 La importancia del NGF en la mediación del prurito así como el dolor se muestra por las altas concentraciones de NGF que se miden en afecciones atópicas, que puede ser un síntoma de prurito y dolor. Los pacientes con dermatitis atópica tienen los niveles de NGF en el suero muy aumentados que se correlacionan positivamente con la gravedad de la afección. Los pacientes con dermatitis de contacto tienen concentraciones locales de NGF más altas y los pacientes con prurigo nodularis también presentan niveles de NGF más altos y niveles de activación de TrkA (Schmelz, Neurosci. Biobehav. Rev. *ido:10.1016/j. neubiorev.* 2008.12.004, 2009).

45 Se han estudiado los efectos de los anticuerpos anti-NGF administrados sistémicamente por inyección intraperitoneal sobre los síntomas en un modelo de ratón de dermatitis atópica y los resultados "sugieren que los anticuerpos anti-NGF bloquean los efectos de NGF en la periferia del sistema nervioso y suprimen las inervaciones epidérmicas, dermatitis y comportamiento de rascado" (Takano et al. J. Pharmacol Sci 99:277:284, 2005). Aunque, el estudio descubrió que los anticuerpos anti-NGF no alteraban los niveles de NGF en el suero, no disminuían la concentración de NGF en las áreas cutáneas ensayadas, y no suprimían completamente el comportamiento de rascado. Por lo tanto, sigue existiendo la necesidad de reducir más completamente o eliminar el picor asociado a dermatitis atópica. El documento CA2738129 desvela un aptámero que tiene una actividad inhibitoria sobre el NGF.

50 Un grupo creciente de pruebas indica que las funciones de NGF median en ciertos estados dolorosos. Se ha demostrado que los anticuerpos anti-NGF pueden producir un efecto analgésico término y químico sostenido, así como bloquear la hiperalgesia que se desarrolla por la inflamación inducida por carragenano (McMahon et al., Nat. Med. 1:774, 1995). Los estudios de una molécula pequeña antagonista del receptor de NGF para el bloqueo de la bioactividad de NGF han indicado un efecto analgésico sobre el estado doloroso neuropático e inflamatorio (Owolabi et al., J. Pharmacol. Exp. Ther. 289:1271, 1999). En el estudio de Owolabi et al., el efecto analgésico de la actividad inhibitoria de NGF de la molécula pequeña puede ser menor que la de la morfina dependiendo de la vía de administración. Aunque los opioides, tales como la morfina, tienen muchos efectos secundarios no deseados, sigue existiendo la necesidad de proporcionar analgesia en la variedad de estados dolorosos mediados por NGF que permita flexibilidad en la administración eficaz.

Sumario

65 La invención se define en las reivindicaciones.

La presente divulgación proporciona distintos aptámeros que se unen a la subunidad beta del factor de crecimiento nervioso, a la que se hace referencia individualmente en el presente documento como "aptámero β -NGF", y a los métodos para utilizar dichos aptámeros β -NGF para tratar enfermedades o trastornos mediados por β -NGF, incluyendo el tratamiento del dolor y prurito y afecciones pruríticas. Se incluyen composiciones farmacéuticas o formulaciones compuestas por un aptámero β -NGF o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Las composiciones de la presente divulgación se pueden preparar en cualquier forma adecuada de dosificación farmacéuticamente aceptable. Las formulaciones y dosificaciones que se describen en el presente documento se diseñan para maximizar la eficacia clínica en el tratamiento de distintas afecciones, tales como el dolor, y el prurito y las afecciones pruríticas, a la vez que se disminuye o minimizan simultáneamente los efectos secundarios adversos.

La presente divulgación proporciona además métodos para prevenir, tratar o mejorar una enfermedad o afección mediada por β -NGF, comprendiendo los métodos la administración de un aptámero β -NGF o una composición farmacéutica del aptámero β -NGF aun vertebrado, específicamente un mamífero, más específicamente un ser humano. Específicamente, la presente divulgación proporciona métodos para tratar, prevenir o mejorar el dolor, y el prurito y las afecciones pruríticas. En algunos aspectos, la enfermedad o afección mediada por β -NGF es una en la que la actividad de β -NGF puede dar lugar directa o indirectamente a prurito en algún estadio de la enfermedad. En algunos aspectos de la divulgación, la enfermedad o afección que se va a tratar, prevenir o mejorar es dermatitis o eccema. En otras realizaciones, la enfermedad o afección que se va a tratar, prevenir o mejorar es la dermatitis atópica.

En un aspecto de la divulgación, se puede conseguir un efecto terapéutico (por ejemplo, tratando, previniendo o mejorando el dolor y prurito y afecciones pruríticas) administrando un aptámero β -NGF tal como el aptámero que se expone y que se puede unir a β -NGF independientemente del método de suministro del aptámero al paciente que se va a tratar. El efecto terapéutico se puede conseguir por la administración del aptámero β -NGF de manera que se exponga, y se una a β -NGF y de esta manera se evite o reduzca la unión de β -NGF a uno o más de sus distintos receptores celulares. El receptor celular puede ser el p75. El receptor celular puede ser un receptor Trk. El receptor celular puede ser TrkA. En otro aspecto más, el aptámero β -NGF evita o reduce el nivel de fosforilación del receptor β -NGF y otras proteínas celulares internas.

Los métodos proporcionados engloban la administración del aptámero β -NGF en asociación con uno o más principios activos secundarios. Dicha administración puede ser secuencial o en una composición de combinación.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método de diagnóstico in vitro que comprende poner en contacto un aptámero β -NGF con una muestra sospechosa de comprender β -NGF. En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método de diagnóstico in vivo que comprende proporcionar un aptámero β -NGF marcado adecuadamente, inyectar el aptámero en un individuo sospechoso de tener una enfermedad o afección mediada por β -NGF, y detectar el aptámero marcado con el fin de diagnosticar o evaluar el estado de salud del individuo. El marcador utilizado se seleccionará de acuerdo con la modalidad de imagen que se vaya a utilizar.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 ilustra las curvas de unión para el aptámero 2426-66 (■) (SEQ ID NO: 1) en comparación con la biblioteca aleatoria (○)

Las Figuras 2A y 2B representan las secuencias de consenso de aptámero utilizando 454 secuenciaciones para el aptámero 2426-66 (SEQ ID NO: 1).

La Figura 3 ilustra la estrategia de dimerización nº 1 para un aptámero β -NGF.

La Figura 4 ilustra la estrategia de dimerización nº 2 para un aptámero β -NGF.

La Figura 5 ilustra gráficamente la capacidad de distintos aptámeros para inhibir la diferenciación inducida por β -NGF humana de células PC12 como se ensaya en el ensayo de crecimiento de neuritas descrito en el Ejemplo 4.

La Figura 6 ilustra gráficamente la inhibición del crecimiento de neuritas mediado por β -NGF en función a la concentración de aptámero para el aptámero 2426-66 (■) (SEQ ID NO: 1) y su variante truncada 2426-66-50 (○) (SEQ ID NO: 2), que se mide como se describe en el Ejemplo 4.

La Figura 7 ilustra gráficamente la inhibición del crecimiento de neuritas mediado por β -NGF humana, β -NGF de ratón y β -NGF de rata por el aptámero 2426-66 (SEQ ID NO: 1) y las variantes truncadas 2426-66-50 (SEQ ID NO: 2) y 2426-66-53 (SEQ ID NO: 43). Los tres aptámeros inhibían la β -NGF de ratón casi tan eficazmente como la β -NGF humana, e inhibía la β -NGF de rata en menor extensión.

La Figura 8 ilustra gráficamente los resultados de un ensayo de fosforilación de TrkA utilizando aptámeros 2426-66 (SEQ ID NO: 1) y variantes truncadas 2426-66-50 (SEQ ID NO: 2) y 2426-66-3 (SEQ ID NO: 5).

La Figura 9 ilustra gráficamente un ensayo de fosforilación de TrkA para el aptámero truncado 2426-66-50 (SEQ ID NO: 2) utilizando β -NGF de ratón y de rata.

La Figura 10 representa las modificaciones de la pirimidina C-5 que se utilizan para preparar los aptámeros descritos en el presente documento.

La Figura 11 ilustra gráficamente la reducción de la frecuencia de rascado durante cuatro semanas en ratones enfermos tratados con el aptámero 24-66-50 (SEQ ID NO: 2) (●), pero no en los ratones no tratados (■) o los

ratones tratados con un ungüento hidrófilo (HO) (▲), como se describe en el Ejemplo 5. Se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre el tratamiento con aptámero y sin tratamiento (*), o el tratamiento con aptámero y el tratamiento con HO (#), como se determina por el ensayo t.

5 La Figura 12 ilustra gráficamente la reducción de la puntuación de afección cutánea clínica durante cuatro semanas en ratones enfermos tratados con aptámero 2426-66-50 (SEQ ID NO: 2), (d), pero no en ratones sin tratar (■) o ratones tratados con HO (▲), como se describe en el Ejemplo 5. Se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre el tratamiento con aptámero y no tratamiento (*), o el tratamiento con aptámero y el tratamiento con HO (#), como se determinó por el ensayo t.

10 Descripción detallada

Se hará ahora referencia en detalle a realizaciones representativas de la invención. Aunque la invención se describirá en conjunción con realizaciones enumeradas, se entenderá que la invención no tiene la intención de limitarse a estas realizaciones. Por el contrario, la invención tiene la intención de cubrir todas las alternativas, modificaciones y equivalentes que se puedan incluir en el alcance de la presente invención según se define en las reivindicaciones.

20 Un experto en la técnica reconocerá que muchos métodos y materiales similares o equivalentes a los que se describen en el presente documento, que se podrían utilizar en, y que estén en el alcance, de la práctica de la presente invención. La presente invención no está limitada de ninguna manera por los métodos y materiales descritos.

25 A menos de que se defina otra cosa, los términos técnicos y científicos que se utilizan en el presente documento tienen el mismo significado que se entiende habitualmente por un experto en la técnica a la que pertenece la invención. Aunque se pueden utilizar cualquiera de los métodos, dispositivos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento en la práctica o ensayo de la invención, los métodos, dispositivos y materiales preferidos se describen ahora.

30 Todas las publicaciones, documentos de patente publicados, y solicitudes de patente citados en la presente divulgación son indicativas del nivel técnico de la técnica a la que pertenece la divulgación.

35 Como se utiliza en la presente divulgación, incluyendo las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares “un”, “una” y “el” incluyen las referencias al plural, a menos de que el contenido dicte claramente otra cosa, y se utilizan de manera intercambiable con “al menos uno” y “uno o más”. Por lo tanto, la referencia a “un aptámero” incluye las mezclas de aptámeros, y similares.

40 Como se utiliza en el presente documento, el término “aproximadamente” representa una modificación o variación insignificante del valor numérico tal como si la función básica del artículo al que se refiere el valor numérico no hubiera cambiado.

La expresión “cada uno” cuando se utiliza en el presente documento para hacer referencia a una pluralidad de artículos tiene la intención de referirse al menos a dos de los artículos. No es necesario que todos los artículos que forman la pluralidad satisfagan una limitación adicional asociada.

45 Como se utiliza en el presente documento, los términos “comprende”, “que comprende”, “incluye”, “que incluye”, “contiene”, “que contiene” y cualquier variación de los mismos, tienen la intención de cubrir una inclusión no excluyente, tal como un proceso, método, producto por proceso o composición de materia que comprende, incluye, o contiene un elemento o lista de elementos no incluye solo los elementos sino que puede incluir otros elementos no listados expresamente o inherentes a dicho proceso, método, producto por proceso, o composición de materia.

50 Como se utiliza en el presente documento, el término “nucleótido” se refiere a un ribonucleótido o un desoxirribonucleótido o una forma modificada de los mismos, así como a un análogo de los mismos. Los nucleótidos incluyen especies que incluyen purinas (por ejemplo, adenina, hipoxantina, guanina, y sus derivados y análogos) así como pirimidinas (por ejemplo, citosina, uracilo, timina, y sus derivados y análogos).

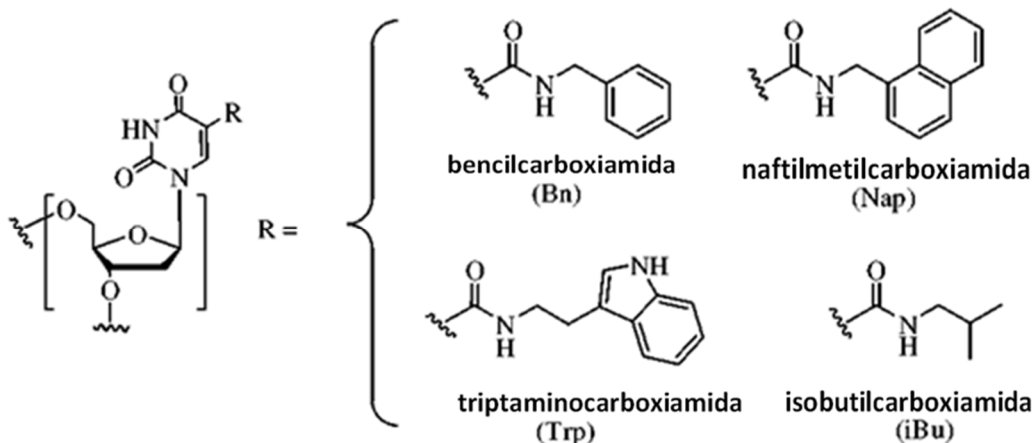
55 Como se utiliza en el presente documento, “ácido nucleico”, “oligonucleótido” y “polinucleótido” se utilizan de manera intercambiable para referirse a un polímero de nucleótidos e incluyen el ADN, ARN, híbridos ARN/ADN y modificaciones de estos tipos de ácidos nucleicos, oligonucleótidos y polinucleótidos, en los que se incluye la unión de varias entidades o restos a las unidades de nucleótido en cualquier posición. Los términos “polinucleótido”, “oligonucleótido” y “ácido nucleico” incluyen las moléculas de cadena doble o sencilla así como las moléculas de triple hélice. El ácido nucleico, oligonucleótido y polinucleótido son términos más amplios que el término aptámero y por lo tanto, los términos ácido nucleico, oligonucleótido y polinucleótido incluye polímeros de nucleótidos que son aptámeros pero los términos ácido nucleico, oligonucleótido y polinucleótido no se limitan a aptámeros.

65 Como se utiliza en el presente documento, los términos “modificar”, “modificado”, “modificación”, y cualquier variación de los mismos, cuando se utilizan en referencia a un oligonucleótido, significa que al menos uno de las

cuatro bases de nucleótidos constituyentes (es decir, A, G, T/U, y C) del oligonucleótido es un análogo o éster de un nucleótido de origen natural. En algunas realizaciones, el nucleótido modificado confiere al oligonucleótido una resistencia a nucleasas. Una pirimidina con una sustitución en la posición C-5 es un ejemplo de un nucleótido modificado. Las modificaciones pueden incluir modificaciones en la matriz, metilaciones, combinaciones de emparejamiento de bases inusuales tales como las isobases isocitidina e isoguanidina, y similares. Las modificaciones pueden incluir también modificaciones 3' y 5', tales como protección. Otras modificaciones pueden incluir la sustitución de uno o más de los nucleótidos de origen natural con un análogo, modificaciones internucleótido tal como, por ejemplo, las uniones sin carga (por ejemplo, metilfosfonatos, fosfotriésteres, fosfoamidatos, carbamatos, etc.) y las uniones con carga (por ejemplo, fosfortioatos, fosforoditioatos, etc.), los que son con intercaladores (por ejemplo, acridina, psoraleno, etc.), los que contienen quelantes (por ejemplo, metales, metales radioactivos, boro, metales oxidantes, etc.), los que contienen alquilantes, y los que tienen enlaces modificados (o ejemplo, ácidos nucleicos alfa anoméricos, etc.). Además, se pueden sustituir cualquiera de los grupos hidroxilo presentes habitualmente en el azúcar de un nucleótido por un grupo fosfonato o un grupo fosfato, protegidos por los grupos protectores convencionales; o activados para preparar enlaces adicionales con nucleótidos adicionales o a un soporte sólido. Los grupos del extremo 3' o 5' pueden fosforilarse o sustituirse con aminas, restos de grupos protectores orgánicos de desde aproximadamente 1 a aproximadamente 20 átomos de carbono, polímero de polietilenglicol (PEG) que en una realización varía desde aproximadamente 10 a aproximadamente 80 kDa, polímeros de PEG en otra realización que varía desde aproximadamente 20 a aproximadamente 60 kDa, u otros polímeros hidrófilos o hidrófobos biológicos o sintéticos. En una realización, las modificaciones son en la posición del C-5 de las pirimidinas. Estas modificaciones se pueden producir por medio de un enlace amida directamente en la posición C-5 o por otros tipos de enlaces.

Los polinucleótidos pueden contener también formas análogas de azúcares ribosa o desoxirribosa que son conocidas en general en la técnica, que incluyen 2'-O-metil-, 2'-O-alil-, 2'-fluoro- o 2'-azido-ribosa, análogos carbocíclicos del azúcar, azúcares α -anoméricos, azúcares epiméricos tales como arabinosa, xilosas, y lixosas, azúcares piranosa, azúcares furanosa, pseudoheptulosas, análogos acíclicos y análogos de nucleósidos abásicos tales como metil ribósido. Como se ha señalado anteriormente, uno o más de los enlaces fosfodiéster se pueden sustituir por grupos de unión alternativos. Estos grupos de unión alternativos incluyen realizaciones en las que el fosfato se sustituye por P(O)S ("tioato"), P(S)S ("dilitioato"), (O)NR₂ ("amidato"), P(O)R, P(O)OR', CO o CH₂ ("formacetal"), en los cuales cada R o R' es independientemente H o un alquil sustituido o no sustituido (1-20 C) que contiene opcionalmente un enlace éter (-O-), arilo, alqueno, cicloalquilo, cicloalqueno o araldilo. No todos los enlaces de un polinucleótido tienen que ser idénticos. La sustitución de formas análogas de azúcares, purinas y pirimidinas puede ser ventajosa para diseñar un producto final, así como las estructuras alternativas de matriz como una matriz de poliamida, por ejemplo.

Como se utiliza en el presente documento, la expresión "pirimidina modificada 5'" se refiere a una pirimidina con una modificación en la posición C-5 incluyendo, pero sin limitarse a, los restos que se ilustran en la Figura 10. Ejemplos de pirimidina modificada incluyen los que se describe en la Pat. de EE. UU. N° 5.719.273 y 5.945.527, así como en la Solicitud Provisional de EE. UU. N° 61/264,545, presentada el 25 de noviembre de 2009, titulada "Nuclease Resistant Oligonucleotides". Ejemplos de modificaciones en C-5 incluyen la sustitución de desoxiuridina en la posición C-5 con un sustituyente que se selecciona independientemente de entre: bencilcarboxiamida (alternativamente bencilaminocarbonilo) (Bn), naftilmetilcarboxiamida (alternativamente naftilmetilaminocarbonilo) (Nap), triptaminocarboxiamida (alternativamente triptaminocarbonilo) (Trp), e isobutilcarboxiamida (alternativamente isobutilaminocarbonilo) (iBu) como se ilustra inmediatamente a continuación.



Las modificaciones de una pirimidina modificada en C-5 también se pueden combinar con, únicamente o en cualquier composición con modificaciones de azúcar en posición 2', modificaciones de aminas exocíclicas, y sustitución de 4-tiouridina y similares.

Las pirimidinas modificadas en C-5 representativas incluyen: 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-desoxiuridina (BndU), 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-O-metiluridina, 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-fluorouridina, 5-(N-isobutilcarboxiamida)-2'-desoxiuridina (iBudU), 5-(N-isobutilcarboxiamida)-2'-O-metiluridina, 5-(N-isobutilcarboxiamida)-2'-fluorouridina, 5-(N-triptaminocarboxiamida)-2'-desoxiuridina (TrpdU), 5-(N-triptaminocarboxiamida)-2'-O-metiluridina, 5-(N-triptaminocarboxiamida)-2'-fluorouridina, cloruro de 5-(N-[1-(3-trimetilamonio) propil] carboxiamida)-2'-desoxiuridina, 5-(N-naftilmetilcarboxiamida)-2'-desoxiuridina (NapdU), 5-(N-naftilmetilcarboxiamida)-2'-O-metiluridina, 5-(N-naftilmetilcarboxiamida)-2'-fluorouridina o 5-(N-[1-(2,3-dihidroxipropil)] carboxiamida)-2'-desoxiuridina.

Si está presente, se puede dar una modificación de la estructura de nucleótido antes o después del ensamblaje de un polímero. Se puede interrumpir una secuencia de nucleótidos con componentes no nucleotídicos. Se puede modificar un polinucleótido adicionalmente tras la polimerización, tal como por conjugación con un componente marcador.

Como se utiliza en el presente documento, la expresión "al menos una pirimidina" cuando se refiere a modificaciones de un ácido nucleico, se refiere a uno, varios, o todas las pirimidinas del ácido nucleico, indicando que cualquiera o todos los casos de cualquiera o todas las C, T o U de un ácido nucleico pueden estar modificadas o no.

Como se utiliza en el presente documento, "ligando de ácido nucleico", "aptámero", y "clon" se utilizan de manera intercambiable para referirse a un ácido nucleico de origen no natural que tiene una acción deseable sobre una molécula diana. Una acción deseable incluye, pero no se limita a, unión a la diana, cambio catalítico de la diana, reacción con la diana en una manera que modifica o altea la diana o la actividad funcional de la diana, unión covalente de la diana (como en un inhibidor suicida), y facilitar la reacción entre la diana y otra molécula. En una realización, la acción es la unión específica de afinidad con una molécula diana, siendo dicha molécula diana una estructura química tridimensional distinta de un polinucleótido que se une al ligando de ácido nucleico por medio de un mecanismo que es independiente del emparejamiento de bases de Watson/Crick o la formación de triple hélices, en el que el aptámero no es un ácido nucleico que tiene una función fisiológica conocida o que está unido por la molécula diana. Los aptámeros para una diana determinada incluye los ácidos nucleicos que se identifican a partir de una mezcla candidata de ácidos nucleicos, en el que el aptámero es un ligando de la diana, por un método que comprende: (a) poner en contacto la mezcla candidata con la diana, en la que los ácidos nucleicos tienen un aumento de afinidad por la diana con respecto a otros ácidos nucleicos de la mezcla de candidatos se puede separar de la mezcla de candidatos restante; (b) separar los ácidos nucleicos con aumento de afinidad de la mezcla de candidatos restante; y (c) amplificar los ácidos nucleicos con aumento de afinidad para dar lugar a una mezcla de ácidos nucleicos enriquecidos con ligando, de manera que se identifiquen los aptámeros para la molécula diana. Se reconoce que las interacciones de afinidad son un según un grado, sin embargo, en este contexto, la "afinidad de unión específica" de un aptámero por su diana significa que el aptámero se une a su diana en general con un grado de afinidad mucho mayor de lo que se une a otros componentes, no dianas, de la mezcla o muestra. Un "aptámero" o "ácido nucleico ligando" es un grupo de copias de un tipo o especie de ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótidos particular. Un aptámero puede incluir cualquier número adecuado de nucleótidos. "Aptámeros" se refiere a más de uno de dicho grupos de moléculas. Los diferentes aptámeros tienen un mismo o diferente número de nucleótidos. Los aptámeros pueden ser ADN o ARN y pueden ser de cadena sencilla o cadena doble, o contiene regiones de doble o triple cadena.

Como se utiliza en el presente documento, "proteína" significa como un sinónimo de "péptido", "polipéptido", o "fragmento peptídico". Un polipéptido, proteína, péptido, o fragmento peptídico "purificado" está sustancialmente libre de material celular u otras proteínas contaminantes de la célula, tejido o fuente libre de células de la que se obtiene la secuencia de aminoácidos, o sustancialmente libre de precursores químicos u otros agentes químicos cuando se sintetizan químicamente.

Como se utiliza en presente documento, "modular" significa alterar, sea aumentando o disminuyendo, el nivel de un péptido o polipéptido, o alterar, sea aumentando o disminuyendo, la estabilidad o actividad de un péptido o un polipéptido. El término "inhibir" significa disminuir el nivel de un péptido o un polipéptido o disminuir la actividad o estabilidad de un péptido o un polipéptido. Como se describe en el presente documento, la proteína que se modula o inhibe es la β -NGF.

Como se utiliza en el presente documento, el término "bioactividad" indica un efecto sobre uno o más procesos celulares o extracelulares (por ejemplo, por medio de la unión, señalización, etc.) que puede tener un impacto sobre procesos fisiológicos o patofisiológicos.

Como se utiliza en el presente documento, las expresiones "factor de crecimiento nervioso", "NGF" y " β -NGF" se refiere a la subunidad beta del factor de crecimiento nervioso y variantes de la misma que mantienen al menos parte de la actividad de NGF. Como se utiliza en el presente documento, NGF incluye todas las especies mamíferas de la secuencia nativa de NGF, incluyendo la humana, canina, felina, murina, de primate, equina, y bovina.

Como se utiliza en el presente documento, "receptor de NGF" se refiere a un polipéptido que se une o se activa por el NGF. Los receptores NGF incluyen el receptor TrkA y el receptor p75 de cualquier especie mamífera, incluyendo, pero sin limitarse a, seres humanos, caninos, felinos, murinos, equinos, primates, y bovinos.

Un “aptámero β -NGF” es un aptámero que es capaz de unirse a y modifica la actividad de β -NGF. Como se utiliza en el presente documento, un “aptámero β -NGF” se refiere a un aptámero que es capaz de unirse a β -NGF y/o inhibe la actividad biológica de β -NGF y/o las rutas corriente abajo mediadas por la señalización de NGF.

5 Como se utiliza en el presente documento, las expresiones “enfermedad o afección médica mediada por β -NGF” se refiere a enfermedades o afecciones médicas en las que la actividad de β -NGF puede dar lugar directa o indirectamente a dolor o prurito en algún estadio del proceso de la enfermedad, incluyendo cualquiera de las enfermedades o afecciones médicas listadas en la Tabla 7. Por lo tanto, el tratamiento con un aptámero β -NGF
10 inhibe el dolor o prurito que se produce debido a la actividad de β -NGF en estas enfermedades o afecciones médicas. El aptámero contra β -NGF puede bloquear además la unión de β -NGF a uno o más de sus receptores.

Como se utiliza en el presente documento, “dolor” se refiere a dolor agudo, dolor crónico, dolor nociceptivo, dolor visceral, dolor somático, dolor no nociceptivo, dolor neuropático, dolor simpático, o a dolor relacionado con procesos de inflamación mediados por β -NGF.

15 El término “prurito” se refiere a un picor que puede variar desde una sensación ligera a una intensa sensación de picor doloroso. El picor puede acompañar una enfermedad cutánea primaria o puede ser un síntoma de una enfermedad sistémica –a veces el único síntoma. Las enfermedades de la piel en las que el picor puede ser más grave incluyen, entre otras, sarna, pediculosis, picaduras de insectos, xerosis, urticaria, dermatitis atópica, dermatitis de contacto, liquen plano, miliaria y dermatitis herpetiformis. Las causas sistémicas del prurito incluyen enfermedad
20 hepática o renal crónica y linfoma.

Las expresiones “trastorno cutáneo” y “enfermedad de la piel” se refiere a cualquier enfermedad o afección que afecta o implica la piel, incluyendo afecciones cutáneas tales como dermatitis atópica, ictiosis, xeroderma, dermatitis seborreica, dermatitis alérgica de contacto, alopecia, pénfigo, dermatitis herpetiformis, psoriasis, candidiasis, acné, dermatofitosis, erupción del pañal, dermatitis seborreica infantil, eccema, parásitos intestinales y daños de la piel
25 por, por ejemplo, heridas, quemaduras, e incontinencia fecal y urinaria.

Como se utiliza en el presente documento, la expresión “farmacéuticamente aceptable” significa aprobado por una agencia reguladora de un gobierno federal o de un estado o listado en la Farmacopea de EE. UU. u otra farmacopea reconocida en general para su uso en animales y, más particularmente, en seres humanos. El término “vehículo” se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente, o vehículo con el que se administra el agente terapéutico e incluye, pero no se limita a, líquidos estériles tales como agua o aceites.

30 Una “sal farmacéuticamente aceptable” o “sal” de un aptámero β -NGF es un producto del compuesto desvelado que contiene un enlace iónico y se produce normalmente por la reacción del compuesto desvelado con un ácido o una base adecuada para la administración de un individuo. Una sal farmacéuticamente aceptable puede incluir, pero no se limita a, sales por adición de ácido, que incluyen hidroclouros, hidrobromuros, fosfatos, sulfatos, sulfatos hidrogenados, alquilsulfonatos, arilsulfonatos, arilalquilsulfonatos, acetatos, benzoatos, citratos, maleatos, fumaratos, succinatos, lactatos, y tartratos; cationes alcalinometálicos tales como Li, Na, K, sales metálicas alcalinotérreas tales como Mg o Ca, o sales de amina orgánicas.

Una “composición farmacéutica” es una formulación que comprende un aptámero β -NGF en forma adecuada para la administración a un individuo. Una composición farmacéutica se formula normalmente para que sea compatible con su vía de administración pretendida. Ejemplos de vías de administración incluyen, pero no se limitan a, la oral y parenteral, por ejemplo, administración intravenosa, intradérmica, subcutánea, inhalación, tópica, transdérmica, transmucosa, y rectal.

Como se utiliza en el presente documento, la expresión “cantidad terapéuticamente eficaz” generalmente significa la cantidad necesaria para mejorar al menos un síntoma de un trastorno o afección que se va a prevenir, reducir o tratar como se describe en el presente documento. La frase “cantidad terapéuticamente eficaz” como se refiere a los aptámeros β -NGF de la presente divulgación significa la dosificación de aptámero que proporciona la respuesta farmacológica específica para la que se administra el aptámero en un número de individuos significativo que tienen necesidad de dicho tratamiento. Se enfatiza que una cantidad terapéuticamente eficaz de un aptámero que se
50 administra a un individuo en particular, en un caso en particular no siempre será eficaz para tratar las afecciones/enfermedades que se describen en el presente documento, incluso aunque dicha dosificación se considere que es una cantidad terapéuticamente eficaz por los expertos en la técnica.

El método SELEX

60 Los términos “SELEX” y “proceso SELEX” se utilizan de manera intercambiable en el presente documento para referirse en general a una combinación de (1) la selección de ácidos nucleicos que interactúan con una molécula diana de una manera deseable, por ejemplo, uniéndose con alta afinidad a una proteína, con (2) la amplificación de los ácidos nucleicos seleccionados. El proceso SELEX puede utilizarse para identificar aptámeros con alta afinidad
65 para una molécula diana específica o biomarcador.

El SELEX incluye en general la preparación de una mezcla de ácidos nucleicos candidatos, unión de la mezcla de candidatos a la molécula diana deseada para formar un complejo de afinidad, separación de los complejos de afinidad de los ácidos nucleicos candidatos no unidos, separación y aislamiento del ácido nucleico del complejo de afinidad, purificación del ácido nucleico e identificación de una secuencia de aptámero específica. El proceso puede incluir múltiples rondas para definir adicionalmente la afinidad del aptámero seleccionado. El proceso puede incluir etapas de amplificación en uno o más puntos del proceso. Véase, por ejemplo, la Patente de EE. UU. N° 5.475.096, titulada "Nucleic Acid Ligands". El proceso SELEX se puede utilizar para generar un aptámero que se una covalentemente a su diana así como un aptámero que se una covalentemente a su diana. Véase, por ejemplo, la Patente de EE. UU. N° 5.705.337 titulada "Systematic Evolution of Nucleic Acid Ligands by Exponential Enrichment: Chemi-SELEX".

El proceso SELEX se puede utilizar para identificar aptámeros de alta afinidad que contienen nucleótidos modificados que confieren características mejoradas al aptámero, tales como, o ejemplo una mejor estabilidad in vivo o mejores características de suministro. Ejemplos de dichas modificaciones incluyen sustituciones químicas en la ribosa y/o fosfato y/o posiciones de bases. Los aptámeros identificados en el proceso SELEX que contienen nucleótidos modificados se describen en la Patente de EE. UU. N° 5.660.985, titulada "High Affinity Nucleic Acid Ligands Containing Modified Nucleotides", que describe derivados de oligonucleótidos que contienen derivados de nucleótidos modificados químicamente en las posiciones 5' y 2' de pirimidinas. La patente de EE. UU. N° 5.580.737, véase anteriormente, describe aptámeros altamente específicos que contienen uno o más nucleótidos modificados con 2'-amino (2'-NH₂), 2'-fluoro (2'-F), y/o 2'-O-metil (2'-OMe). Véase también, la Publicación de Solicitud de Patente N° 20090098549, titulada "SELEX y PHOTOSELEX", que describe bibliotecas de ácidos nucleicos que tienen propiedades físicas y químicas expandidas y sus usos en SELEX y photoSELEX.

La Solicitud Provisional de EE. UU. serie N° 61/264,545, presentada el 25 de Noviembre de 2009, titulada "Nuclease Resistant Oligonucleotides", describe métodos para producir oligonucleótidos con resistencia a nucleasas mejorada. Los oligonucleótidos resistentes a nucleasas incluyen al menos una pirimidina modificada en la posición C-5 con un grupo que se selecciona de entre los expuestos en la Figura 10. En varias realizaciones, las modificaciones incluyen la sustitución de desoxiuridina de la posición C-5 con un sustituyente seleccionado independientemente de entre: bencilcarboxiamida (Bn), naftilmetilcarboxiamida (Nap), triptaminocarboxiamida (Trp), y isobutilcarboxiamida como se ha ilustrado anteriormente.

El SELEX también se puede utilizar para identificar aptámeros que tienen características de velocidad de disociación deseadas. Véase la Publicación de Patente N° 20090004667, titulada "Method for Generating Aptamers with Improved Off-Rates", que describe métodos SELEX mejorados para generar aptámeros que se pueden unir a moléculas diana. Se describen métodos para producir aptámeros y fotoaptámeros que tienen velocidades de disociación más lentas de sus moléculas diana respectivas. Los métodos que implican poner en contacto la mezcla de candidatos con la molécula diana, permitiendo la formación de complejos ácido nucleico-diana, y llevar a cabo un proceso de enriquecimiento de velocidad de disociación en el que los complejos de ácido nucleico-ácido nucleico con velocidades de disociación rápidas y sin reformación, mientras que los complejos con velocidades de disociación lentas se mantienen intactos. Adicionalmente, los métodos incluyen el uso de nucleótidos modificados en las mezclas de ácidos nucleicos para generar aptámeros con una actuación de la velocidad de disociación mejorada (véase, la Publicación de Patente de EE. UU. N° 20090098549, titulada "SELEX y PhotoSELEX").

"Diana" o "molécula diana" o "diana" se refiere en el presente documento a cualquier compuesto sobre el que puede actuar un ácido nucleico de una manera deseable. Una molécula diana puede ser una proteína, péptido, ácido nucleico, carbohidratos, lípidos, polisacáridos, glucoproteína, hormonas, receptor, antígeno, anticuerpo, virus, agente patógeno, sustancia tóxica, sustrato, metabolito, análogo de estado de transición, cofactor, inhibidor, fármaco, colorante, nutriente, factor de crecimiento, célula, tejido, cualquier parte o fragmento de cualquiera de los anteriores, etc., sin limitación. Virtualmente cualquier efector biológico o químico puede ser una diana adecuada. Las moléculas de cualquier tamaño pueden servir como dianas. Una diana se puede modificar también de ciertas maneras para aumentar la posibilidad o fuerza de una interacción entre la diana y el ácido nucleico. una diana también puede incluir una variación menor de un compuesto particular o molécula, tal como, en el caso de una proteína, por ejemplo, variaciones menores en la secuencia de aminoácidos, formación de enlaces disulfuro, glucosilación, lipidación, acetilación, fosforilación, o cualquier otra manipulación o modificación, tal como la conjugación con un componente marcador, que no altere sustancialmente la inmunidad de la molécula. Una "molécula diana" o "diana" es un grupo de copias de un tipo o especie de moléculas o estructura multimolecular que es capaz de unirse a un aptámero. "Moléculas diana" o "dianas" se refiere a más de uno de dichos grupos de moléculas. Las realizaciones de procesos SELEX en los que la diana es un péptido como se describe en la Patente de EE. UU. N° 6.376.190, titulada "Modified SELEX Processes Without Purified Protein.". En el presente caso, la diana es β -NGF.

Aptámeros

Los aptámeros de la presente divulgación se identifican utilizando el método SELEX mejorado para identificar aptámeros que tienen velocidades de disociación lentas como se describe en el Ejemplo 1, que describe un método representativo para la selección y producción de un aptámero ADN contra β -NGF. La forma de β -NGF que se utiliza en el proceso de selección era una proteína recombinante humana que se aísla como la forma monomérica de la

proteína con un peso molecular de 13,2 kDa. En solución, el monómero forma un dímero. Utilizando este método, se identificó el aptámero de ADN contra β -NGF diseñado es el aptámero 2426-66 (SEQ ID NO: 1).

5 Utilizando el aptámero 2426-66 (SEQ ID NO: 1) se llevaron a cabo estudios adicionales para identificar la secuencia de mínima longitud necesaria para mantener una fuerte afinidad por β -NGF como se describe en el Ejemplo 2. Minimizar la longitud de secuencia permite una síntesis más reproducible de aptámero en un proceso químico y ayuda potencialmente a la absorción a través de la piel así como la incorporación en una formulación farmacéutica. Los estudios de truncado dieron lugar a la identificación de aptámeros que tienen varias secuencias truncadas que eran también enlazadores ávidos para β -NGF, con valores de K_d hasta de aproximadamente 30 nM. Estas
10 secuencias incluyen las SEQ ID NO: 1, 3, 9-44, y 149 (Tablas 3 y 4). En el aptámero particular 2426-66-50 (SEQ ID NO: 2; Tabla 4), se identificó un 28mero que tiene una K_d de 1,4 nM para β -NGF.

Los estudios adicionales de secuencias se llevaron a cabo sobre el grupo de secuencias en el que se seleccionó el 2426-66 (SEQ ID NO: 1). El método que se utilizó para la secuenciación fue Secuenciación 454. Este es un método
15 a gran escala, de alto rendimiento que utiliza pirosecuenciación paralela. El método proporciona una preparación de muestras imparcial y un análisis de secuencia muy preciso. En este método, los fragmentos de ADN biotinilados se capturan en perlas de estreptavidina y luego se amplifican por PCR. La cadena no biotinilada se libera de la perla y se utiliza como una biblioteca de matriz de cadena única de ADN. Esta biblioteca se amplifica entonces por PCR. Cada perla contiene entonces fragmentos de las copias clónicas de ADN amplificado. Esta biblioteca de perlas se
20 utiliza entonces en un proceso de secuenciación enzimática. Los datos de la secuenciación se utilizaron entonces para identificar una secuencia de consenso para un aptámero β -NGF. Además, los estudios de sustitución de nucleótidos descritos en el Ejemplo 3 dieron lugar al descubrimiento de que siete de nueve posiciones BndU en la secuencia de consenso eran deseables para la unión con β -NGF, pero dos posiciones BndU se podían sustituir con dT sin pérdida de actividad de unión. La secuencia de consenso se muestra en la Figura 2A, junto con una
25 representación gráfica de la frecuencia de nucleótidos en cada posición relativa al aptámero 2426-66 (SEQ ID NO: 1). Como se ilustra en la Figura 2A, la secuencia de consenso es:

BAZGRGGRSZWGGGGZZWADCCGZZRZG (SEQ ID NO: 45)

30 en la que

B se selecciona de cualquier nucleótido distinto de A;

R se selecciona independientemente de una A o G;

S se selecciona de entre una C o G;

35 W se selecciona independientemente de entre una Z o T;

D se selecciona de cualquier nucleótido distinto de C; y

Z se selecciona independientemente de entre un nucleótido modificado, específicamente una pirimidina modificada.

40 En un aspecto, B se selecciona de entre una C, G o Z; D se selecciona de entre A, G o Z y R, S, W y Z como se ha definido anteriormente.

En otro aspecto, la secuencia de consenso es:

45 BAZGRGGRSZZGGGGZZADCCGZZRZG (SEQ ID NO: 3)

en la que B, R, S, D y Z son como se ha definido anteriormente.

En algunos aspectos, Z es una uridina modificada. En otros, Z es una pirimidina modificada en C-5 como se ha
50 definido anteriormente. En otras realizaciones más, Z es una pirimidina modificada en C-5 que se selecciona independientemente de entre el grupo que consiste en 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-desoxiuridina (BndU), 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-O-metiluridina, 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-fluorouridina, 5-(N-isobutilcarboxiamida)-2'-desoxiuridina (iBudU), 5-(N-isobutilcarboxiamida)-2'-O-metiluridina, 5-(N-isobutilcarboxiamida)-2'-fluorouridina, 5-(N-triptaminocarboxiamida)-2'-desoxiuridina (TrpdU), 5-(N-triptaminocarboxiamida)-2'-O-metiluridina, 5-(N-triptaminocarboxiamida)-2'-fluorouridina, cloruro de 5-(N-[1-(3-trimetilamonio) propil]carboxiamida)-2'-desoxiuridina,
55 5-(N-naftilmetilcarboxiamida)-2'-desoxiuridina (NapdU), 5-(N-naftilmetilcarboxiamida)-2'-O-metiluridina, 5-(N-naftilmetilcarboxiamida)-2'-fluorouridina y 5-(N-[1-(2,3-dihidroxipropil)]carboxiamida)-2'-desoxiuridina). En otros, Z es 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-desoxiuridina (BndU). Cualquiera de estas modificaciones de nucleótido se anticipa como igualmente eficaces para promover uniones de alta afinidad con β -NGF y proporcionan una velocidad de
60 disociación baja.

Como se utiliza en el presente documento, "secuencia de consenso", cuando se utilizan en referencia a una serie de ácidos nucleicos relacionados, se refiere a una secuencia de nucleótidos que refleja la elección más común de bases en cada posición de la secuencia en donde la serie de ácidos nucleicos relacionada se ha sometido a un
65 análisis matemático y/o de secuencia intensivo.

La presente divulgación proporciona aptámeros β -NGF identificados utilizando el método SELEX y que se enumeran en las Tablas 3 y 4 (SEQ ID NO: 1, 2, 9-44, y 149). Los aptámeros contra β -NGF que son sustancialmente análogos a cualquiera de los aptámeros enumerados y que tienen una capacidad sustancialmente similar para unirse a β -NGF que la de un aptámero seleccionado de entre el grupo de aptámeros expuestos en las Tablas 3 y 4 (SEQ ID NO: 1, 2, 9-44, y 149) también se engloban en la presente divulgación. Además, los aptámeros contra β -NGF que tienen sustancialmente la misma forma estructural que los aptámeros identificados en el presente documento y que tienen una capacidad sustancialmente similar de unión a β -NGF que las de un aptámero seleccionado de entre el grupo de aptámeros expuestos en las Tablas 3 y 4 (SEQ ID NO: 1, 2, 9-44, y 149) también se engloban en la presente divulgación.

En un aspecto, la presente divulgación proporciona un aptámero que específicamente se une a β -NGF e incluye una secuencia de ácido nucleico primaria. En una realización, la secuencia de ácido nucleico primaria se selecciona de entre SEQ ID NO: 1, 2, 9-44, y 149. En otras realizaciones, la secuencia de ácido nucleico primaria selecciona de manera que es al menos aproximadamente un 75 % idéntica, al menos aproximadamente un 80 % idéntica, al menos aproximadamente un 85 %, al menos aproximadamente un 90 %, o al menos aproximadamente un 95 % idéntica a una secuencia de ácido nucleico primaria que se selecciona de entre SEQ ID NO: 1, 2, 9-44, y 149.

Las expresiones "identidad de secuencia", "porcentaje de identidad de secuencia", "porcentaje de identidad", "% idéntica", "% de identidad", y variaciones de las mismas, cuando se utilizan en el contexto de dos o más secuencias de ácidos nucleicos, se utilizan de manera intercambiable para hacer referencia a dos o más secuencias o subsecuencias que son la misma o tienen un porcentaje especificado de nucleótidos que son los mismos, cuando se comparan y alinean con máxima correspondencia, como se mide utilizando un algoritmo de comparación de secuencias o por inspección visual. Para las comparaciones de secuencia, normalmente una secuencia actúa como secuencia de referencia con la cual se comparan las secuencias de ensayo. Cuando se utiliza un algoritmo de comparación de secuencia, las secuencias de referencia y ensayo se introducen en una computadora, se diseñan las coordenadas de subsecuencias si fuera necesario, y se diseñan los parámetros del programa del algoritmo de secuencias. El algoritmo de comparación de secuencias calcula entonces el porcentaje de identidad de secuencia para las secuencias de ensayo con respecto a la secuencia de referencia, basándose en los parámetros del programa diseñados. Se puede llevar a cabo el alineamiento óptimo de las secuencias para la comparación, por ejemplo, por el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, *Adv. Appl. Math.*, 2:482, 1981, por el algoritmo de homología de alineamiento de Needleman y Wunsch, *J. Mol. Biol.*, 48:443, 1970, por el método de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85:2444, 1988, por programas de computadora de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, y TFASTA del Paquete de software Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.), o por inspección visual (véase, en general, Ausubel, F. M. et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, pub. por Greene Publishing Assoc. y Wiley-Interscience (1987)).

Un ejemplo de un algoritmo que es adecuado para determinar el porcentaje de identidad de secuencia es el algoritmo utilizado en la herramienta de búsqueda de alineamiento local básica (de aquí en adelante "BLAST"), véase, por ejemplo, Altschul et al., *J. Mol. Biol.* 215:403-410, 1990 y Altschul et al., *Nucleic Acids Res.*, 15:3389-3402, 1997. El software para llevar a cabo los análisis BLAST están disponibles públicamente en el Centro Nacional de Información Biotecnológica (de aquí en adelante "NCBI"). Los parámetros por defecto que se utilizan en la determinación de identidad de secuencia utilizando el software disponible en el NCBI, por ejemplo, BLASTN (para las secuencias de nucleótidos) se describen en McGinnis et al., *Nucleic Acids Res.*, 32:W20-W25, 2004.

Como se utiliza en el presente documento, cuando se describe el porcentaje de identidad de un ácido nucleico tal como el aptámero β -NGF, cuya secuencia es al menos, por ejemplo, aproximadamente un 95 % idéntica a una secuencia de nucleótido de referencia, se considera que la secuencia de ácido nucleico es idéntica a la secuencia de referencia excepto que la secuencia de ácido nucleico puede incluir hasta cinco mutaciones puntuales por cada 100 nucleótidos de la secuencia de aminoácidos de referencia. En otras palabras, para obtener una secuencia de ácido nucleico deseada, la secuencia que es al menos aproximadamente un 95 % idéntica a una secuencia de ácido nucleico de referencia, hasta el 5 % de los nucleótidos de la secuencia de referencia se pueden eliminar o sustituir con otros nucleótidos, o algunos nucleótidos hasta el 5 % del número total de nucleótidos de la secuencia de referencia se pueden insertar en la secuencia de referencia (al que se hace referencia en el presente documento como inserción). Estas mutaciones de la secuencia de referencia para generar la secuencia deseada pueden producirse en las posiciones del extremo 5' o 3' de la secuencia de nucleótidos de referencia o cualquiera entre las posiciones terminales, dispersas individualmente entre los nucleótidos de la secuencia de referencia o en uno o más grupos contiguos en la secuencia de referencia. La secuencia de referencia (de consulta) puede ser cualquiera de las secuencias de nucleótidos completas que se muestran en SEQ ID NO: 1, 2, 9-44 y 149, o cualquier fragmento de cualquiera de estas secuencias.

En un aspecto, cada una de las secuencias de consenso de SEQ ID NO: 45 o SEQ ID NO: 3 se pueden modificar para incluir al menos una inserción. En una realización, las secuencias de consenso de SEQ ID NO: 45 o SEQ ID NO: 3 se modifican de manera que un nucleótido (N) se inserta en la secuencia de consenso entre las bases 9 y 120. En otra realización, la secuencia de consenso de SEQ ID NO: 45 o SEQ ID NO: 3 se modifica de manera que un nucleótido (N) se inserta en la secuencia de consenso entre las bases 15 y 16. En otra realización, las secuencias de consenso de SEQ ID NO: 45 o SEQ ID NO: 3 se modifica de manera que un nucleótido (N) se inserta

en la secuencia de consenso entre las bases 9 y 10 y un nucleótido (N) adicional se inserta en la secuencia de consenso entre las bases 15 y 16. Estas realizaciones se ilustran de la siguiente manera:

5 BAZGRGGRSN⁽⁰⁻¹⁾ ZWGGGGN⁽⁰⁻¹⁾ ZZWADCCGZZRZG (SEQ ID NO: 154)
 BAZGRGGRSN⁽⁰⁻¹⁾ ZZGGGGN⁽⁰⁻¹⁾ ZZZADCCGZZRZG (SEQ ID NO: 155)

en las que B, R, S, D y Z son como se ha definido anteriormente y N se selecciona independientemente de cualquier nucleótido de origen natural o modificado (A, C, G, o T).

10 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un aptámero β-NGF que, al unirse a β-NGF, modula una función de β-NGF. En varias realizaciones, el aptámero modula una función de β-NGF in vivo. En varias realizaciones el aptámero β-NGF incluye una secuencia de nucleótidos contiguos que son idénticas a una secuencia de nucleótidos contiguos incluida en cualquiera de SEQ ID NO: 1, 2, 9-44 y 149. En varias realizaciones la secuencia de nucleótidos contiguos en el aptámero β-NGF incluye una secuencia de desde aproximadamente 4 a
 15 aproximadamente 30 nucleótidos contiguos que es idéntica a una secuencia de aproximadamente 4 a aproximadamente 30 nucleótidos contiguos incluidos en cualquiera de SEQ ID NO: 1, 2, 9-44, 149. En una realización a modo de ejemplo, el aptámero β-NGF incluye una secuencia de 30 nucleótidos contiguos que son idénticos a una secuencia de 30 nucleótidos contiguos incluidos en cualquiera de SEQ ID NO: 1, 2, 9-44 y 149. En otra realización a modo de ejemplo, el aptámero β-NGF incluye una secuencia de 20 nucleótidos contiguos que son idénticos a una secuencia de 20 nucleótidos contiguos incluidos en cualquiera de SEQ ID NO: 1, 2, 9-44 y 149. En otra realización a modo de ejemplo más, el aptámero incluye una secuencia de 8 nucleótidos contiguos que son idénticos a una secuencia de 8 nucleótidos contiguos incluidos en cualquiera de SEQ ID NO: 1, 2, 9-44 y 149. En otra realización a modo de ejemplo más, el aptámero β-NGF incluye una secuencia de 4 nucleótidos contiguos que son idénticos a una secuencia de 4 nucleótidos contiguos incluidos en cualquiera de SEQ ID NO: 1, 2, 9-44 y 149.

25 En un aspecto de la divulgación, el aptámero β-NGF es SEQ ID NO: 1. En otro, el aptámero β-NGF es SEQ ID NO: 2. En otro más, el aptámero β-NGF se deriva de la secuencia de consenso de SEQ ID NO: 3. En otros aspectos, el aptámero β-NGF es cualquiera de SEQ ID NO: 9-44 y 149. En un aspecto, el aptámero β-NGF es al menos aproximadamente un 95 % idéntico, al menos aproximadamente un 90 % idéntico, al menos aproximadamente un 85 % idéntico, al menos aproximadamente un 80 % idéntico, o al menos aproximadamente un 75 % idéntico con cualquiera de SEQ ID NO: 1, 2, 9-44 y 149. En otro, el aptámero β-NGF incluye una secuencia de cualquiera de SEQ ID NO: 1, 2, 9-44 y 149 y fragmentos de cualquiera de estas.

35 El aptámero β-NGF pueden contener cualquier número de nucleótidos además de la región de unión a β-NGF. En varias realizaciones, el aptámero β-NGF puede incluir hasta aproximadamente 100 nucleótidos, hasta aproximadamente 95 nucleótidos, hasta aproximadamente 90 nucleótidos, hasta aproximadamente 85 nucleótidos, hasta aproximadamente 80 nucleótidos, hasta aproximadamente 75 nucleótidos, hasta aproximadamente 70 nucleótidos, hasta aproximadamente 65 nucleótidos, hasta aproximadamente 60 nucleótidos, hasta aproximadamente 55 nucleótidos, hasta aproximadamente 50 nucleótidos, hasta aproximadamente 45 nucleótidos,
 40 hasta aproximadamente 40 nucleótidos, hasta aproximadamente 35 nucleótidos, hasta aproximadamente 30 nucleótidos, hasta aproximadamente 25 nucleótidos, y hasta aproximadamente 20 nucleótidos.

En otro aspecto más, el aptámero β-NGF se selecciona de entre un aptámero que tiene características de unión similares y capacidad para tratar el dolor o prurito asociado a β-NGF y las afecciones pruríticas como un aptámero que se selecciona de entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, 2, 9-44 y 149.

El aptámero β-NGF se puede seleccionar para que tenga cualquier constante de disociación (K_d) para β-NGF. En una realización a modo de ejemplo, el aptámero β-NGF tiene una constante de disociación (K_d) para β-NGF de aproximadamente 10 nM o menos. En otra realización a modo de ejemplo, el aptámero β-NGF tiene una constante de disociación (K_d) para β-NGF de aproximadamente 15 nM o menos. En otra realización a modo de ejemplo más, el aptámero β-NGF tiene una constante de disociación (K_d) para β-NGF de aproximadamente 20 nM o menos. En otra realización a modo de ejemplo más, el aptámero β-NGF tiene una constante de disociación (K_d) para β-NGF de aproximadamente 25 nM o menos. Una constante de disociación adecuada se puede determinar con el ensayo de unión utilizando una titulación multipunto y ajustando la ecuación $y = (\text{máx}-\text{mín}) (\text{Proteína}) / (K_d + \text{Proteína}) + \text{mín}$ como se describe en el ejemplo 1, posteriormente. Se tiene que entender que la determinación de las constantes de disociación es altamente dependiente de las condiciones en las que se miden y por lo tanto este número puede variar significativamente con respecto a factores tales como el tiempo de equilibración, etc. En otras realizaciones, el aptámero β-NGF es un aptámero con una K_d que es menor o igual a la K_d de un aptámero seleccionado de entre SEQ ID NO: 1, 2, 9-44 y 149.

60 El aptámero 2426-66 (SEQ ID NO: 1) se une en una estequiometría 1:1 con el monómero β-NGF. Como β-NGF forma un homodímero fuerte que se necesita para la reacción con sus receptores diana, se puede conseguir una inhibición de la actividad de β-NGF más eficaz utilizando una forma dimerica u otra forma multimérica del aptámero 2426-66. Por lo tanto, en otra realización, el aptámero β-NGF es una multimerización de cualquier combinación de las secuencias anteriores. Las Figuras 3 y 4 ilustran las estrategias potenciales para la dimerización del aptámero 2426-66. Las mismas estrategias se podrían aplicar a cualquier secuencia de aptámero con las características de

unión apropiadas para β -NGF. Se podrían utilizar también estrategias similares para crear aptámeros multiméricos con tantas copias de la secuencia de aptámero como se desee. En este caso, se utiliza la secuencia de 2426-66-50 (SEQ ID NO: 2) del aptámero truncado, pero se podría utilizar también la secuencia de 2426-66 de longitud completa. La Figura 3 ilustra una construcción cabeza a cola de dos secuencias 2426-66 con, uno o más

5 hexaetilenglicol (HEG) o fosfatos de azúcar abásicos como enlazadores entre las dos secciones de la nueva secuencia de aptámero. La Figura 4 representa una dimerización de la secuencia 2426-66 por medio del uso de una fosforamidita ramificada que incluye opcionalmente hexaetilenglicol (HEG) o fosfatos de azúcar abásicos como enlazadores.

10 Composiciones farmacéuticas que incluyen el aptámero β -NGF

La presente divulgación engloba composiciones farmacéuticas que incluyen al menos un aptámero contra β -NGF y al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los vehículos adecuados se describen en "Remington: The Science and Practice of Pharmacy, vigesimoprimer Edición," publicado por Lippincott Williams & Wilkins, que se

15 incorpora en el presente documento por referencia. Las composiciones farmacéuticas que incluyen al menos un aptámero contra β -NGF y al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable también pueden incluir uno o más principios activos que no sean un inhibidor de β -NGF.

Los aptámeros descritos en el presente documento pueden utilizarse en cualquier forma de dosificación farmacéuticamente aceptable, incluyendo pero sin limitarse a las formas de dosificación inyectables, dispersiones líquidas, geles, aerosoles, ungüentos, cremas, formulaciones liofilizadas, polvos secos, comprimidos cápsulas, formulaciones de liberación controlada, formulaciones de fusión rápida, formulaciones de liberación retardada, formulaciones de liberación extendida, formulaciones de liberación pulsátil, formulaciones mezclas de liberación inmediata y liberación controlada, etc. Específicamente, los aptámeros descritos en el presente documento se

20 pueden formular: (a) para la administración que se selecciona de entre cualquiera de administración oral, pulmonar, intravenosa, intra-arterial, intratecal, intra-articular, rectal, oftálmica, colónica, parenteral, intracisternal, intravaginal, intraperitoneal, local, bucal, nasal, y tópica; (b) en una forma de dosificación que se selecciona de entre cualquiera de dispersiones líquidas, geles, aerosoles, ungüentos, cremas, comprimidos, papelillos, y cápsulas; (c) en una forma de dosificación que se selecciona de entre cualquiera de formulaciones liofilizadas, polvos secos, formulaciones de fusión rápida, formulaciones de liberación controlada, formulaciones de liberación retardada, formulaciones de liberación extendida, formulaciones de liberación pulsátil, y formulaciones mezcladas de liberación inmediata y liberación controlada; o (d) cualquier combinación de las mismas.

Las soluciones o suspensiones utilizadas para la aplicación parenteral, intradérmica, o subcutánea puede comprender uno o más de los siguientes componentes: (1) un diluyente estéril tal como agua para inyección, solución salina, aceites no volátiles, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol y otros disolventes sintéticos; (2) agentes antibacterianos tales como alcohol bencílico o metilparabenos; (3) antioxidantes tales como ácido ascórbico o bisulfito sódico; (4) agentes quelantes tales como etilendiamina de ácido tetraacético; (5) tampones tales como acetatos, citratos o fosfatos; y (5) agentes para el ajuste de la tonicidad tales como cloruro sódico o dextrosa. El pH se puede ajustar con ácidos o bases, tales como ácido clorhídrico o hidróxido sódico. Una preparación parenteral se puede envasar en ampollas, jeringas desechables o viales de múltiples dosis hechos de cristal o plástico.

35

40

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para su uso inyectable pueden incluir soluciones acuosas estériles (cuando son hidrosolubles) o dispersiones y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones inyectables estériles o dispersiones. Para la administración intravenosa, los vehículos adecuados incluyen solución salina fisiológica, agua bacteriostática, Cremofor EL (BASF, Parsippany, N.J.) o solución salina tampón fosfato (PBS). En todos los casos, la composición debería ser estéril y debería ser fluida hasta que sea fácil de inyectar con jeringa. La composición farmacéutica debería ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y debería conservarse de la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos. El término "estable", como se utiliza en el presente documento, significa permaneces en un estado o condición que sean adecuados para la administración a un paciente.

45

50

El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión, incluyendo por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, y polietilenglicol líquido, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez apropiada se puede mantener, por ejemplo, por el uso de un revestimiento tal como lecitina, manteniendo el tamaño necesario de partícula en el caso de dispersión y por el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de microorganismos se puede conseguir por distintos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal, y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol o sorbitol, y sales inorgánicas tales como cloruro sódico en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede conseguir incluyendo en la composición un agente que retrasa la absorción, por ejemplo monoestearato de aluminio y gelatina.

55

60

Las soluciones inyectables estériles se pueden preparar incorporando el principio activo (por ejemplo, un aptámero β -NGF) en la cantidad necesaria en una disolvente apropiado con uno o una combinación de los ingredientes enumerados anteriormente, según se necesite, seguido por una esterilización por filtración. En general, las dispersiones se preparan incorporando al menos un aptámero β -NGF en un vehículo estéril que contienen un medio

65

de dispersión básico y cualquier otro ingrediente necesario. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos a modo de ejemplo de preparación incluyen el secado al vacío y el secado por congelación, que darán lugar ambos a un polvo del aptámero β -NGF más cualquier ingrediente adicional deseado a partir de una solución esterilizada previamente por filtración de los mismos.

5 Otras composiciones incluyen en general un diluyente inerte o un vehículo comestible. Se pueden incluir, por ejemplo, en cápsulas de gelatina o comprimirse en comprimidos. Con fines de administración oral terapéutica, el aptámero β -NGF se puede incorporar con excipientes y se utilizan en forma de comprimidos, trociscos o cápsulas. Las composiciones orales pueden prepararse también utilizando un vehículo fluido para su uso como un enjuague bucal, en el que el compuesto del vehículo fluido se aplica vía oral y se expectora o se deglute. Los agentes de unión farmacéuticamente compatibles, y/o materiales adyuvantes se pueden incluir como parte de la composición.

15 Para la administración por inhalación, los compuestos se suministran en forma de un pulverizador aerosol a partir de un contenedor o dispensador presurizado que contiene un propulsor adecuado, por ejemplo, un gas tal como dióxido de carbono, un líquido nebulizado, o un polvo seco a partir de un dispositivo adecuado. Para la administración transdérmica o transmucosa, se utilizan en la formulación, penetrantes apropiados para penetrar la barrera. Dichos penetrantes se conocen en general en la técnica, e incluyen, por ejemplo para la administración transmucosa, detergentes, sales biliares, y derivados del ácido fusídico. La administración transmucosa puede conseguirse por medio del uso de pulverizadores nasales o supositorios. Para la administración transdérmica, los reactivos activos se formulan en ungüentos, pomadas, geles, o cremas como se conoce en general en la técnica. Los reactivos se pueden preparar también en forma de supositorios (por ejemplo, con bases de supositorios convencionales tales como manteca de coco y otros glicéridos) o enemas de retención para suministro rectal.

25 En una realización, el aptámero β -NGF se formula para administración tópica. Como se utiliza en el presente documento "administración tópica" se refiere al suministro de un aptámero β -NGF a un animal poniendo en contacto, directamente o de otra manera, una formulación que comprende el aptámero β -NGF a toda o una parte de la piel (epidermis) de un animal. El término engloba varias vías de administración incluyendo, pero sin limitarse a, tópica y transdérmica. Una necesidad común para estos modos de administración se suministra eficazmente al tejido o estrato diana. En un aspecto, la administración tópica se utiliza como medio para penetrar la epidermis o dermis y en último término se consigue el suministro sistémico del aptámero β -NGF. En otro aspecto, la administración tópica se utiliza como un medio de suministro selectivo del aptámero β -NGF a la epidermis o dermis de un animal o el estrato específico de las mismas.

35 Para la administración tópica, el aptámero β -NGF se puede formular en ungüentos, cremas, lociones, ungüentos oculares, gotas oculares, gotas óticas, vendajes impregnados, y aerosoles, polvos medicados, adhesivos medicados, espumas, y puede contener aditivos o excipientes convencionales apropiados, incluyendo, por ejemplo, conservantes o disolventes para ayudar la penetración de fármacos, y emolientes en ungüentos, geles y cremas. Dichas formulaciones tópicas también pueden contener vehículos compatibles convencionales, por ejemplo etanol u oleil alcoholes para lociones. Dichos vehículos pueden constituir desde aproximadamente un 1 % a aproximadamente un 98 % por peso de las formulaciones; más habitualmente, dichos vehículos constituirán hasta aproximadamente un 80 % por peso de la formulación. Las formulaciones específicas para el suministro tópico de aptámeros se describen en la Patente de EE. UU. N° 6.841.539 y Publicación de EE. UU. N° 20050096287. La dosificación suministrada en una formulación tópica se diseña para acomodarla a un modo de suministro continuo.

45 En una realización, se prepara un aptámero β -NGF con un vehículo que lo protegerá contra la eliminación rápida del cuerpo. Por ejemplo, se puede utilizar una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes y sistemas de suministro microencapsulado. Se pueden utilizar polímeros biocompatibles, biodegradables tales como acetato de etileno vinilo, polianhídridos ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres, y ácido poliláctico. Los métodos para la preparación de dichas formulaciones serán evidentes para los expertos en la técnica. Los materiales también se pueden obtener comercialmente en Alza Corporation y Nova Pharmaceuticals, Inc.

55 Las suspensiones liposómicas (incluyendo los liposomas con anticuerpos monoclonales contra antígenos víricos dirigidos a células infectadas) se pueden utilizar también como vehículos farmacéuticamente aceptables. Esos se pueden preparar de acuerdo con métodos conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, como se describe en la Pat. de EE. UU. N° 4.522.811.

60 Adicionalmente, las suspensiones del aptámero β -NGF se pueden preparar como suspensiones para inyecciones oleosas apropiadas. Los disolventes o vehículos lipófilos adecuados incluyen los aceites grasos, tales como aceite de sésamo, o ésteres de ácidos grasos sintéticos, tales como el oleato de etilo, triglicéridos o liposomas. Los polímeros amino policatiónicos no lipídicos también se pueden utilizar para el suministro. Opcionalmente, la suspensión puede incluir también estabilizadores adecuados o agentes para aumentar la solubilidad de compuestos y permite la preparación de soluciones altamente concentradas.

65 En algunos casos, puede ser especialmente ventajoso formular composiciones orales o parenterales en forma de dosificación unitaria para facilidad de administración y uniformidad de dosificación. La forma de unidad de dosificación como se utiliza en el presente documento se refiere a unidades separadas físicamente adecuadas como

dosificaciones unitarias para el sujeto que se va a tratar; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de un aptámero β -NGF que se calcula que produce el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico necesario. La especificación de las formas de dosificación unitaria de los aptámeros β -NGF descritos en el presente documento se dictan por o dependiendo directamente de las características únicas del aptámero β -NGF en particular y el efecto terapéutico en particular que se va a conseguir, y las limitaciones inherentes en la técnica de la composición tal como un principio activo para el tratamiento de individuos.

Las composiciones farmacéuticas que comprenden al menos un aptámero β -NGF pueden incluir uno o más excipientes farmacéuticos. Ejemplos de dichos excipientes incluyen, pero no se limitan a, agentes de unión, agentes de carga, agentes lubricantes, agentes suspensores, edulcorantes, agentes saborizantes, conservantes, tapones, agentes humectantes, desintegrantes, agentes efervescentes, y otros excipientes. Dichos excipientes se conocen en la técnica. Los excipientes a modo de ejemplo incluyen: (1) agentes aglutinantes que incluyen varias celulosas y polivinilpirrolidona reticulada, celulosa microcristalina, tal como Avicel® PH101 y Avicel® PH102, celulosa microcristalina silicada (ProSolv SMCC™), goma de tragacanto y gelatina; (2) agentes de carga tales como distintos almidones, lactosa, monohidrato de lactosa, y lactosa anhidra; (3) agentes desintegrantes tales como ácido alginico, Primogel, almidón de maíz, polivinilpirrolidona ligeramente reticulada, almidón de patata, almidón de maíz, y almidones modificados, croscarmelosa sódica, cross-povidona, glucolato de almidón sódico, y mezclas de los mismos; (4) lubricantes, incluyendo agentes que actúan sobre la fluidez de un polvo que se va a comprimir, incluyendo estearato magnésico, dióxido de silicio coloidal, tal como Aerosil® 200, talco, ácido esteárico, estearato cálcico, y gel de sílice; (5) sustancias de deslizamiento tales como dióxido de sílice coloidal; (6) conservantes, tales como sorbato potásico, metilparabeno, propilparabeno, ácido benzoico y sus sales, otros ésteres de ácido parahidroxibenzoico tales como el butilparabeno, alcoholes tales como alcohol etílico o bencílico, compuestos fenólicos tales como fenol, o compuestos cuaternarios tales como cloruro de benzalconio; (7) diluyentes tales como cargas inertes farmacéuticamente aceptables, tales como celulosa microcristalina, fosfato cálcico dibásico, sacáridos, y/o mezclas de cualquiera de los anteriores; ejemplos de diluyentes incluyen celulosa microcristalina, tales como Avicel® PH101 y Avicel® PH102; lactosa tal como monohidrato de lactosa, lactosa anhidra, y Pharmatose® DCL21; fosfato cálcico dibásico tal como Emcompress®; manitol; almidón; sorbitol; sacarosa; y glucosa; (8) agentes edulcorantes, incluyendo cualquier edulcorante natural o artificial, tal como sacarosa, sacarina, xilitol, sacarina sódica, ciclamato, aspartamo, y acesulfamo; (9) agentes saborizantes, tales como pipermin, salicilato de metilo, saborizante de naranja, Magasweet® (marca registrada de MAFCO), sabor a chicle, sabores de frutas, y similares; y (10) agentes efervescentes, incluyendo parejas efervescentes tales como un ácido orgánico y un carbonato o bicarbonato. Los ácidos orgánicos adecuados incluyen, por ejemplo, ácidos cítrico, tartárico, málico, fumárico, adípico, succínico, alginico y anhídridos y sales ácidas. Los carbonatos y bicarbonatos adecuados incluyen, por ejemplo, carbonato sódico, bicarbonato sódico, carbonato potásico, bicarbonato potásico, carbonato magnésico, carbonato glicina sódica, carbonato de L-lisina, y carbonato de arginina. De manera alternativa, solamente el componente de bicarbonato sódico de la pareja efervescente puede estar presente.

En varias realizaciones, las formulaciones descritas en el presente documento son sustancialmente puras. Como se utiliza en el presente documento, "sustancialmente pura" significa que el principio activo (aptámero β -NGF) es la especie predominante presente (es decir, en una base molecular es más abundante que cualquier otra especie individual de la composición). En una realización, una parte sustancialmente purificada es una composición en la que el principio activo comprende al menos aproximadamente el 50 por ciento (en una base molecular) de todas las especies macromoleculares. En general, una composición sustancialmente pura incluirá más de aproximadamente un 80 % de todas las especies moleculares presentes en la composición. En varias realizaciones, una composición sustancialmente pura incluirá al menos aproximadamente un 85 %, al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 95 %, o al menos aproximadamente un 99 % de todas las especies macromoleculares presentes en la composición. En varias realizaciones, el principio activo está purificado hasta la homogeneidad esencial (no se pueden detectar especies contaminantes en la composición por métodos de detección convencionales) en los que la composición consiste esencialmente en una única especie macromolecular.

Kits que comprenden las composiciones de aptámero β -NGF

La presente divulgación proporciona kits que comprenden cualquiera de los aptámeros β -NGF descritos en el presente documento. Dichos kits pueden comprender, por ejemplo, (1) al menos un aptámero β -NGF; y (2) al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como un disolvente o solución. Los componentes adicionales del kit pueden incluir opcionalmente, por ejemplo: (1) cualquiera de los excipientes farmacéuticamente aceptables identificados en el presente documento, tal como estabilizantes, tapones, etc., (2) al menos un envase, vial o aparato similar para mantener y/o mezclar los componentes del kit; y (3) un aparato de suministro.

Métodos de tratamiento

La presente divulgación proporciona aptámeros para su uso en métodos para prevenir o tratar (por ejemplo, aliviar uno o más síntomas de) afecciones médicas, por medio del uso de un aptámero β -NGF a un paciente que necesita el mismo. Los aptámeros descritos también pueden utilizarse para terapia profiláctica. En algunas realizaciones el aptámero β -NGF se administra por vía tópica.

El aptámero β -NGF que se utiliza en los métodos del tratamiento puede ser: (1) un nuevo aptámero β -NGF preparado por los métodos descritos en el presente documento, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o un profármaco del mismo.

- 5 El individuo o paciente puede ser un animal (doméstico, de granja o silvestre), incluyendo pero sin limitarse a, gatos, perros, caballos, cerdos y ganado bovino, y preferentemente pacientes humanos. Como se utiliza en el presente documento, los términos paciente, individuo, y sujeto pueden utilizarse de manera intercambiable.

- 10 Como se utiliza en el presente documento, "tratar" describe el manejo y cuidados de un paciente con el fin de tratar una enfermedad, afección o trastorno e incluye la administración de un aptámero β -NGF para prevenir la aparición de los síntomas o complicaciones de una enfermedad, afección o trastorno, para aliviar los síntomas o complicaciones de la enfermedad, afección o trastorno; o para eliminar la presencia de la enfermedad, afección o trastorno en el paciente. Más específicamente, "tratar" incluye la reversión, atenuación, alivio, minimización, supresión o detención de al menos un síntoma perjudicial o efecto de un estado de enfermedad (trastorno),
15 progresión de la enfermedad, agente causal de la enfermedad (por ejemplo, bacterias o virus), u otra afección anormal. El tratamiento, en general continúa mientras mejoren los síntomas y/o patología.

- 20 En varios aspectos, las composiciones desveladas (incluyendo las composiciones tópicas) y los métodos utilizados se utilizan para tratar la dermatitis, que se caracteriza por inflamación superficial o sarpullido de la piel que se caracteriza por enrojecimiento, edema, supuración, costras, escamas y a veces vesículas. El prurito (picor) es común en la dermatitis). Eccema es un término que se utiliza a menudo de manera intercambiable con dermatitis. Ejemplos de dermatitis o eccema incluyen, por ejemplo, dermatitis atópica (también llamado eccema infantil o eccema flexural), dermatitis de contacto (incluyendo alérgica e irritante), eccema xerósico (al que se hace referencia también como eccema asteatósico, grietas o agrietamiento, picor invernal, o prurito hiemalis), dermatitis exfoliativa,
25 dermatitis de pies y manos, neurodermatitis (por ejemplo, liquen simple crónico) dermatitis seborreica (costra de leche en niños, caspa), eccema discoide (al que también se hace referencia como eccema numular, eccema exudativo, eccema microbiano), dishidrosis, eccema venoso (eccema gravitacional, dermatitis por estasis, eccema varicoso, dermatitis por estasis, dermatitis herpetiforme (Enfermedad de Duhring), auto-eccematización (a la que también se hace referencia como reacción id, autosensibilización), dermatitis por cercaria (por ejemplo, picor del nadador o picor de pato), dermatitis de contacto inducida por urushiol, que también se llama dermatitis toxicodendrónica y dermatitis por rhus (por ejemplo, roble venenoso, hiedra venenosa, zumaque), dermatitis solar, y eccema del ama de casa.

- 35 En una realización, los compuestos desvelados o las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, o profármacos, se pueden administrar en combinación con otros tratamientos que mejoran o erradican el picor. Las composiciones incluyen los aptámeros β -NGF desvelados pueden contener, por ejemplo, más de un aptámero, por ejemplo, una IgE, IL-6 y/o aptámero PAR2 y un aptámero β -NGF. En algunos ejemplos, una composición de aptámero β -NGF contiene uno o más aptámeros que se administran en combinación con otra composición anti-prurítica útil, tal como por ejemplo, un anti-histamínico, un analgésico, un anticolinérgico, un fármaco anti-inflamatorio no esteroideo, un
40 esteroide, un agente anti-oxidante, una vitamina, un modificador leucotrieno, un antagonista de interleucina, un inhibidor de mastocitos, un anticuerpo anti-IgE, un inhibidor de re-captación de serotonina selectivo, un antagonista del receptor de la 5-hidroxitriptamina, un antibiótico, un inhibidor de calcineurina, un inhibidor de la histona desacetilasa, gabapentina o naloxona, en la que los principios activos están presentes en forma libre o en forma de una sal farmacéuticamente aceptable, y opcionalmente, al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable, para su uso sistémico o tópico o la administración simultáneamente, por separado, o secuencialmente o similar. En general, serán adecuadas las formas de dosificación disponibles actualmente de agentes terapéuticos conocidos para su uso en dichas combinaciones.
45

- 50 "Terapia de combinación" (o "co-terapia") incluye la administración de una composición de aptámero β -NGF y al menos un segundo agente como parte de un régimen de tratamiento específico que tiene la intención de proporcionar el efecto beneficioso de la co-acción de estos agentes terapéuticos. El efecto beneficioso de la combinación incluye, pero no se limita a, co-acción farmacocinética o farmacodinámica resultante de la combinación de los agentes terapéuticos. La administración de estos agentes terapéuticos en combinación se lleva a cabo normalmente en un periodo de tiempo definido (habitualmente en minutos, horas, días o semanas dependiendo de la combinación seleccionada).

- 55 La "terapia de combinación" puede, pero en general no, tener la intención de englobar la administración de dos o más agentes terapéuticos como parte de regímenes de monoterapia separados que incidentalmente y arbitrariamente dan como resultado las combinaciones de la presente divulgación. La "terapia de combinación" tiene la intención de abarcar la administración de estos agentes terapéuticos de una manera secuencial, es decir, en la que cada agente terapéutico se administra en un momento diferente, así como la administración de estos agentes terapéuticos, o al menos dos de los agentes terapéuticos, de una manera sustancialmente simultánea. La administración sustancialmente simultánea se puede conseguir, por ejemplo, administrando al sujeto una dosis única que tiene una relación fija de cada agente terapéutico o en dosis múltiples, únicas de cada uno de los agentes terapéuticos.
60

- 65 El régimen de dosificación que utiliza aptámeros β -NGF se selecciona de acuerdo con varios factores, que incluyen, por ejemplo, el tipo, especie, edad, sexo, afección médica del paciente, la gravedad de la afección que se va a tratar, la vía de

administración, la función renal y hepática del paciente, y el aptámero β -NGF particular o sal del mismo que se emplee. Un médico o veterinario experto habituado puede determinar fácilmente y prescribir la cantidad eficaz de la composición necesaria para prevenir, contrarrestar o detener el progreso de la afección.

- 5 En general, la dosificación, es decir, la cantidad terapéuticamente eficaz, varía desde aproximadamente 1 μ g a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal del sujeto que se va a tratar, por día.

Eficacia

- 10 El ejemplo 4 ilustra la capacidad de varios aptámeros β -NGF y variantes truncadas de los mismos para inhibir el crecimiento de neuritis mediado por β -NGF humana (Figuras 5-7) y para inhibir la fosforilación de TrkA por β -NGF (Figuras 8 y 9).

- 15 El ejemplo 5 ilustra la eficacia de los aptámeros β -NGF para reducir la frecuencia de rascado y mejorar la afección clínica de la piel por la administración del aptámero 2426-66-50 (SEQ ID NO: 2) a ratones enfermos. Con referencia a la Figura 11, se puede ver que la frecuencia de rascado disminuyó constantemente desde el día 14-28 en los ratones tratados con el aptámero 2426-66-50 (d) en contraste con ningún cambio observado en los ratones no tratados (■) o en ratones tratados con el ungüento hidrófilo (HO) (m). De la misma manera, en referencia a la Figura 12, se puede ver que la afección cutánea clínica mejoraba durante 4 semanas en ratones enfermos tratados con el aptámero 2426-66-50 (SEQ ID NO: 2) (d), y, como con la frecuencia de rascado, no había mejora en los ratones sin tratar (■) o los ratones tratados con HO (m).

Ejemplos

- 25 Los siguientes ejemplos se proporcionan solamente con fines ilustrativos y no tienen la intención de limitar el alcance de la invención que se define en las reivindicaciones adjuntas. Todos los ejemplos descritos en el presente documento se llevan a cabo utilizando técnicas convencionales que son bien conocidas y de rutina por los expertos en la técnica. Las técnicas de biología molecular de rutina descritas en los siguientes ejemplos se pueden llevar a cabo como se describe en los manuales de laboratorio convencionales tales como Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., (2001).

Ejemplo 1. Selección de aptámeros y secuencias

A. Preparación de las mezclas de candidatos

- 35 Se preparó una mezcla de candidatos de oligonucleótidos ssADN parcialmente aleatorizados por extensión por polimerasa de un cebador ADN hibridado con una matriz ssADN biotinilada como se muestra en la Tabla 1. La mezcla de candidatos contenía un casete de 40 nucleótidos aleatorizados que contenía dATP, dGTP, dCTP y BndUTP (5-(N-bencilcarboxiamida-2'-desoxiuridina trifosfato).

- 40 Se combinaron 4,8 nmol del Cebador 1 (SEQ ID NO: 165) que poseía un único cromóforo, nitroazidoanilina (ANA, designado como X en la secuencia) en el extremo 5' y 4 nmol de Matriz 1 (SEQ ID NO: 46) que poseía dos retos de biotina (designado como B' en la secuencia) y 40 posiciones aleatorias (A, C, G, o T) (designadas como N en la secuencia) en 100 μ l de 1x de tampón de ADN polimerasa KOD (Novagen), se calentó a 95 °C durante 8 minutos, y se enfrió en hielo. La mezcla de 100 μ l cebador:matriz se añadió a una extensión de reacción de 400 μ l que contenía 1x tampón de ADN polimerasa KOD, 0,125 U/ μ l de ADN polimerasa KOD XL, y 0,5 mM de cada uno de dATP, dGTP, dCTP y BndUTP, y se incubaron a 70 °C durante 30 minutos. Se capturó el producto de doble cadena por medio de biotinas de cadena de matriz añadiendo 1 ml de perlas magnéticas revestidas de estreptavidina (MagnaBind Streptavidin, Pierce, 5 mg/ml en NaCl 3 M que contenía un 0,05 % de TWEEN-20) y se incubó a 25 °C durante 10 minutos mezclando. Las perlas se lavaron tres veces con 0,75 de tampón SB17T (40 mM de HEPES, pH 7,5, 125 mM de NaCl, 5 mM de KCl, 5 mM de MgCl₂, un 0,05 % TWEEN-20). La cadena de aptámero se eluyó de las perlas con 1,2 ml de NaOH 20 nM, se neutralizó con 0,3 ml de HCl 80 mM, y se tamponó con 15 μ l de HEPES 1 M, pH 7,5. Las mezclas de candidatos se concentró con un Centricon-30 hasta aproximadamente 0,2 ml, y se cuantificó por espectroscopia de absorbancia UV.

55

Tabla 1. Secuencias de matriz y cebadores de SELEX

Denominación de oligonucleótidos	Secuencia (5' → 3')	SEQ ID NO:
Matriz 1	AB'AB'TTTTTTTTGGTCTTGTTTCTTCTCTGTG-(N) ₄₀ -CAGGCAGACGGTCACTC	46
Cebador 1	XGGTCTTGTTTCTTCTCTGTG	165
Cebador 2	ATATATATGAGTGACCGTCTGCCTG	47

Cebador 3	AB'AB'TTTTTTTTGGTCTTGTTCCTTCTCTGTG	48
Cebador 4	TTTTTTTTGGTCTTGTTCCTTCTCTGTG	169

B. Preparación de la proteína diana

5 Se biotiniló el β -NGF humano no marcado (R&D Systems) por acoplamiento covalente de NHS-PE04-biotina (Pierce) a restos de lisina. La proteína (300 pmol en 50 β L) se intercambió a SB17T con una columna de microcentrifuga Sephadex G-25. Se añadió NHS-PE04-biotina a 1,5 nM y se incubó la reacción a 4 °C durante 16 horas. La NHS-PE04-biotina que no reaccionó se retiró con una columna de microcentrifuga Sephadex G-25.

C. Inmovilización de la proteína diana

10 La proteína diana se inmovilizó en perlas paramagnéticas MyOne-SA (MyOne SA, Invitrogen, o de aquí en adelante referidas como perlas SA) para la Ronda 1 de SELEX. Se diluyó la β -NGF a 0,2 mg/ml en 0,5 ml de SB17T y se añadió a 0,5 ml de perlas SA (pre-lavadas dos veces con 20 mM de NaOH y una vez con SB17T). La mezcla se rotó durante 30 minutos a 25 °C y se almacenó a 4 °C hasta su uso.

D. Selección de aptámeros con proceso de enriquecimiento de velocidad de disociación baja y fotoentrecruzamiento

20 Se llevaron a cabo las selecciones con la mezcla de candidatos, comparando la unión entre las muestras con la proteína diana (señal S) y las muestras sin la proteína diana (fondo B). Las primeras tres rondas se llevaron a cabo con selección por afinidad (no fotoentrecruzamiento); la segunda y tercera incluía el proceso de enriquecimiento de velocidad de disociación baja. Las rondas cuatro a nueve incluían tanto el proceso de enriquecimiento de velocidad de disociación baja como el fotoentrecruzamiento.

25 Para cada muestra, se preparó una mezcla de 90 μ l de ADN en SB17T con 10-20 pmoles de mezcla de candidatos (56 pmoles en la primera ronda) y 56 pmoles de cebador inverso. Las muestras se calentaron a 95 °C durante 3 minutos y se enfrió a 37 °C a una velocidad de 0,1 °C/segundo. Las muestras se combinaron con 10 μ l de mezcla de proteína competidora (un 0,1 % de HSA, 10 μ M de caseína y 10 μ M de protrombina en SB17T), se añadieron a 0,5 mg de perlas SA y se incubaron a 37 °C durante 5 minutos con mezclador. Las perlas se retiraron por separación magnética.

35 Las reacciones de unión se llevaron a cabo añadiendo 10 μ l de proteína diana (0,5 μ M en SB17T) o SB17T a 40 μ l de mezclas de ADN y se incubaron a 37 °C durante 30 min. El proceso de enriquecimiento de velocidad de disociación baja se empleó de tres maneras diferentes. En las rondas dos y tres, las muestras se diluyeron 20 veces añadiendo 950 μ l de SB17T (precalentado a 37 °C), y se incubaron a 37 °C durante 15 minutos antes de capturar los complejos. En las rondas cuatro y cinco, las muestras se diluyeron 20 veces añadiendo 950 μ l de SB17T (precalentada a 37 °C), y se incubó a 37 °C durante 30 minutos antes del entrecruzamiento. En las rondas seis y siete, las muestras se diluyeron 20 veces añadiendo 950 μ l de SB17T (precalentado a 37 °C. 50 μ l de cada muestra diluida se diluyeron de nuevo transfiriendo a 950 μ l de SB17T que contenía 10 mM de sulfato de dextrano (5 kDa) (precalentado a 37 °C) para dar una dilución total de 400 veces, y se incubó a 37 °C durante 60 minutos antes del entrecruzamiento. En las rondas ocho y nueve, las muestras se diluyeron 20 veces añadiendo 950 μ l de SB17T (precalentado a 37 °C), y 50 μ l de cada muestra se diluyeron de nuevo transfiriéndolos a 950 μ l de SB17T (precalentado a 37 °C) para dar una dilución de 400 veces. Finalmente, 50 μ l de cada muestra diluida 400 veces se diluyeron de nuevo transfiriéndolos a 950 μ l de SB17T que contenía 10 mM de sulfato de dextrano (5 kDa) (precalentado a 37 °C) para dar una dilución total de 8000 veces, y se incubó a 37 °C durante 60 minutos antes del entrecruzamiento. Cuando se empleaba el foto entrecruzamiento, las reacciones de unión de 1 ml tras el proceso de enriquecimiento de la velocidad de disociación baja se irradiaron desde arriba con una matriz de LED de 470 nm durante 60 segundos antes de la captura de complejos.

50 Los complejos se capturaron en perlas SA por medio de biotinas proteicas añadiendo 0,25 de perlas MyOne SA (Invitrogen) e incubándolas a 25 °C durante 15 minutos con mezclador. El ADN libre se retiró lavando las perlas cinco veces con SB17T. A menos de que se indique, todos los lavados se llevaron a cabo suspendiendo las perlas en 100 μ l de solución de lavado, mezclando durante 30 segundos a 25 °C, separando las perlas con un imán, y retirando la solución de lavado. La cadena de aptámero se eluyó de las perlas añadiendo 85 μ l de NaOH 20 mM, e incubando a 37 °C durante 1 minuto con mezclador. Se transfirieron 80 μ l del eluido de aptámero a un nuevo tubo tras la separación magnética, se neutralizó con 20 μ l de HCl 80 mM, y tamponado con 1 μ l de Tris-HCl 0,5 M, pH 7,5.

60 Cuando se empleó la foto-selección los complejos se capturaron como anteriormente, y el ADN no entrecruzado se retiró lavando las perlas una vez con guanidina-HCl 4 M que contenía un 0,05 % de TWEEEN-20 a 50 °C durante 10 minutos, una vez con 20 mM de NaOH a 25 °C durante 2 minutos, dos veces con SB17T, y una vez con 16 mM de NaCl. El ADN entrecruzado no se retiró de la superficie de las perlas para las etapas de amplificación.

E. Amplificación y purificación de aptámeros

El ADN aptamérico seleccionado se amplificó y cuantificó por QPCR. Se añadieron 48 µl de ADN a 12 µl de mezcla QPCR (5x de tampón ADN polimerasa KOD, 25 mM de MgCl₂, 10 mM de cebador PCR directo (cebador 2, SEQ ID NO: 47), 10 µM de cebador PCR inverso biotinilado (Cebador 3, SEQ ID NO: 48), 5x de SYBR verde I, 0,125 U/µl de ADN polimerasa KOD XL, y 1 mM de cada uno de dATP, dCTP, dGTP, y dTTP y se termocicló en un instrumento QPCR MyIQ Bio-Rad con el siguiente protocolo: 1 ciclo de 99,9 °C, 15 s, 55 °C, 10 s, 68 °C, 30 min, 30 ciclos de 99,9 °C, 15 segundos, 72 °C, 1 minuto. Se hizo la cuantificación con el software del instrumento y el número de copias de ADN seleccionado, con la proteína diana, se comparó para determinar las relaciones entre señal/fondo.

Cuando se empleaba la foto-selección, se preparó una copia de ADNc del ADN seleccionado por extensión de cebador en la superficie de las perlas. Las perlas lavadas se resuspendieron en 20 µl de mezcla de extensión de ADNc (tampón de extensión de cebador que contenía 5 µM de cebador inverso de PCR no biotinilado (cebador 4, SEQ ID NO: 169), 0,5 mM de cada uno de dATP, dCTP, dGTP, y dTTP y 0,125 U/µl de ADN polimerasa KOD XL) y se incubaron a 68 °C durante 30 minutos con mezclado. Las perlas se lavaron 3 veces con SB17T, se eluyó la cadena de ADN c de las perlas añadiendo 85 µl de NaOH 20 mM, e incubando a 37 °C durante 1 minuto mezclando. Se transfirieron 80 µl de aptámero eluido a un nuevo tubo tras la separación magnética, se neutralizaron con 20 µl de HCl 80 mM, y se tamponó con 1 µl de Tris-HCl 0,5 M, pH 7,5. Se amplificó y cuantificó el ADNc por QPCR como anteriormente con 30 ciclos de 99,9 °C, 15 segundos, 72 °C, 1 minuto.

A continuación de la amplificación, se capturó el producto de la PCR en perlas SA por medio de una cadena antisentido biotinilada. Se lavaron 1, 25 µl de perlas SA (10 mg/ml) dos veces con 0,5 ml de NaOH 20 mM, una vez con 0,5 ml de SB17T, se resuspendieron en 1,25 ml de NaCl 3 M + un 0,05 % de Tween, y se almacenaron a 4 °C. Se añadieron 25 ml de perlas SA (10 mg/ml en NaCl T 3 M) a 50 µl de productos de QPCR de doble cadena y se incubaron a 25 °C durante 5 minutos con mezclado. Las perlas se lavaron una vez con SB17T, y la cadena "en sentido" se eluyó de las perlas añadiendo 200 µl de NaOH 20 mM, y se incubaron a 37 °C durante 1 minuto con mezclado. La cadena eluida se desechó y las perlas se lavaron 3 veces con SB17T y una vez con 16 mM de NaCl.

Se preparó la cadena de aptámero en sentido con el cromóforo ANA por extensión de cebador a partir de la cadena antisentido inmovilizada. Las perlas se resuspendieron en 20 µl de mezcla de reacción de extensión de cebador (1x de tampón de extensión de cebador, 1,5 mM de MgCl₂, 5 µM de cebador directo con cromóforo ANA 5' (Cebador 1, SEQ ID NO: 165), 0,5 mM de cada uno de dATP, dCTP, dGTP, y BndUTP, y 0,125 U/µl de ADN polimerasa KOD XL) y se incubó a 68 °C durante 30 minutos con mezclado. Las perlas se lavaron 3 veces con SB17T, y se eluyó la cadena de aptámero de las perlas añadiendo 85 µl de NaOH 20 mM, e incubando a 37 °C durante 1 minuto con mezclado. Se transfirieron 80 µl del aptámero eluido a un nuevo tubo tras la separación magnética, se neutralizó con 20 µl de HCl 80 mM, y se tamponó con 5 µl de HEPES 0,1 M, pH 7,5.

F. Selección de rigurosidad y retroalimentación

La concentración relativa de proteína diana de la etapa de selección se disminuyó cada ronda en respuesta a la relación S/B de la siguiente manera, donde la señal S y el fondo B se han definido en la Sección D anterior:

$$\text{Si } S/B < 10, [P]_{(i+1)} = [P]_i$$

$$\text{Si } 10 \leq S/B < 100, [P]_{(i+1)} = [P]_i / 3.2$$

$$\text{Si } S/B \geq 100, [P]_{(i+1)} = [P]_i / 10$$

donde [P] = concentración de proteína e i = número de ronda actual.

Después de cada ronda de selección, se determinó el estado de convergencia de la mezcla de ADN enriquecido. Se diluyeron 10 µl del producto de la QPCR de doble cadena hasta 200 µl con MgCl₂ 4 mM que contenía 1x de SYBR verde I. Las muestras se cubrieron con 75 µl de aceite de silicio y se analizaron en cuanto a la convergencia utilizando un análisis C₀t que mide el tiempo de hibridación para las mezclas de complejos de oligonucleótidos de cadena doble. Las muestras se termociclaron con el siguiente protocolo: 3 ciclos de 98 °C, 1 minuto, 85 °C, 1 minuto; 1 ciclo de 93 °C, 1 minuto, 85 °C, 15 minutos. Durante los 15 minutos a 85 °C, se midieron las imágenes fluorescentes a intervalos de 5 segundos. La intensidad de fluorescencia se representó en función de log (tiempo), y se observó un aumento de velocidad de hibridación con cada ronda de SELEX, indicando una convergencia de secuencia.

G. Proceso de exploración de clones e identificación de aptámeros

El agrupamiento de la convergencia tras nueve rondas de SELEX se clonó y secuenció. El ADN seleccionado se amplificó con cebadores SELEX no biotinilados para crear ADN AGCT, se purificó utilizando un kit de purificación

5 PCR QIAquick 96 (n° de cat. 28181), y las inserciones purificadas se clonaron utilizando el kit de clonación Stratagene PCR-Script (n° de cat. 211189) según el protocolo del fabricante. Los agrupamientos SELEX ligados se enviaron a un vendedor de secuenciación (Cogenics, Houston, Texas) para la transformación, matriz en placas de 96 pocillos, preparación de ADN y secuenciación. Las secuencias de los 42 clones se obtuvieron y analizaron en cuanto a la convergencia utilizando un software a medida que determina la secuencia de recuentos/número de copias e identifica los patrones de convergencia comunes utilizando un algoritmo de alineamiento local. Las secuencias con representación/número de copias más altos del agrupamiento y las secuencias que convergían con motivos de unión comunes se escogieron por exploración corriente abajo. Se escogieron seis secuencias para análisis adicionales y se prepararon enzimáticamente utilizando el ADN plasmídico obtenido en Cogenics, como matriz para la amplificación por PCR.

H. Medición de la constante de unión en equilibrio (K_d)

15 Las constantes de unión en equilibrio de las 6 secuencias escogidas se midieron en un ensayo de afinidad. El ADN radiomarcado se calentó durante 3 minutos a 95 °C en SB17T-0,002 (SB17T con TWEEN-20 reducido al 0,002 %9 y se enfrió lentamente a 37 °C. Los complejos se formaron mezclando una concentración baja de ADN radiomarcado (~ 1×10^{-11} M) con intervalo de concentraciones de la proteína diana (1×10^{-7} M a 1×10^{-12}) en SB17T-0,002, y se incubó a 37 °C durante 30 minutos. Una parte de cada reacción se transfirió a una membrana de nailon y se secó para determinar los recuentos totales de cada reacción. Los complejos se capturaron con resina ZORBAX (Agilent), se pasó a través de una placa HV MultiScreen (Millipore) al vacío, y se lavaron con 200 μ l de tampón SB17T-0,002 para separar los complejos unidos a proteínas del ADN no unido. La membrana de nilón y la placa HV MultiScreen se procesaron por imagen de fósforo y la cantidad de radioactividad de cada muestra se cuantificó utilizando el FLA-3000 FUJI. La fracción de ADN capturado se representó como una función de la concentración de proteína (P_t) y las constantes de unión en equilibrio (K_d) se determinaron utilizando $y = (\text{máx}-\text{mín}) (P_t)/(K_d + P_t) + \text{mín}$. El clon 2426-66 (SEQ ID NO: 1, listado en la Tabla 3), se seleccionó un 76mero, con una $K_d = 5 \times 10^{-9}$ M como el clon líder para caracterización adicional, véase la Figura 1.

I. Secuenciación profunda del agrupamiento SELEX

30 Para evaluar más completamente las secuencias de la familia de aptámeros 2426-66, el agrupamiento enriquecido se secuenció utilizando tecnología de pirosecuenciación 454. El ADN agrupado se amplificó con 454 cebadores como se ha descrito anteriormente y el producto de la PCR se purificó y normalizó utilizando una placa de normalización Sequel (Invitrogen, n° de cat. A10510-01). El eluido se ejecutó en gel para confirmar el tamaño y la pureza de cada amplicón. El producto de la PCR purificado se secuenció en las instalaciones de pirosecuenciación 454 del Health Science Center de la Universidad de Colorado, Aurora CO.

40 Las secuencias 454 se alinearon con 2426-66 por análisis CLUSTAL. Del total de 1165 secuencias multi-copia, 165 secuencias tienen un patrón similar a 2426-66. Basándose en las similitudes de secuencia 5' en estas secuencias, se alinean en tres grupos. La región media de la secuencia estaba conservada en los tres grupos. Para todas las secuencias se calculó el porcentaje de identidad para cada posición con 2426-66 como se enumera en la Figura 2B. La Tabla 2 enumera varias secuencias representativas de la familia de secuencias de aptámeros 2426-66, donde Z' representa BndU.

Tabla 2. Secuencias representativas del aptámero 2426-66*

45

Denominación de aptámeros	Secuencia (5' → 3')	SEQ ID NO:
2426-87	CAGCGGGACACAZ'GAGGACZ'Z'GGGGZ'Z' Z'GGCCGZ'Z'GZ'GG	49
2426-88	CAGCGGGACACAZ'GAGGACZ'Z'GGGGZ'Z' Z'AGCCGZ'Z'GZ'GC	50
2426-1373	GCAGCGGGACACAZ'GAGGACAZ'GGGGZ'Z' Z'AGCCGZ'Z'GZ'GG	51
2426-1621	GCAGCGGGACACAZ'GAGGACZ'Z'GGGGZ'Z' Z'AGCCGZ'Z'GZ'GG	52
2426-1634	GCGGCGGGACACAZ'GAGGACZ'Z'GGGGZ' Z'Z'AGCCGZ'Z'GZ'GG	53
2426-1627	GCAGCGGGACACAZ'Z'AGGACZ'Z'GGGGZ' Z'Z'AGCCGZ'Z'GZ'GG	54
2426-1372	GCAGCGGAACACAZ'GAGGACZ'Z'GGGGZ' Z'Z'AGCCGZ'Z'GZ'GG	55
2426-1387	GCAGCGGZ'ACACAZ'GAGGACZ'Z'GGGGZ' Z'Z'AGCCGZ'Z'GZ'GG	56
2426-1527	CAGCGGGACACAZ'GAGGACZ'Z'GGGZ'Z'Z' AGCCGZ'Z'GZ'GGCA	57

ES 2 610 159 T3

2426-1753	Z'CAGCGGGACACAZ'GAGGACZ'Z'GGGGZ' Z'Z'AGCCGZ'Z'GZ'GG	58
2426-1003	GCAGCGGGACACAZ'GAGGACZ'Z'GGGGZ' Z'Z'AGCCGZ'Z'GZ'GG	59
2426-1626	GCAGCGGGACACAZ'GAGGACZ'Z'GGGGZ' Z'Z'AGZ'CGZ'Z'GZ'GG	60
2426-1380	GCAGCGGGACACAZ'GAGGACZ'Z'GGGGZ' Z'Z'AGCCAZ'Z'GZ'GG	61
2426-1625	GCAGCGGGACACAZ'GAGGACZ'Z'GGGGZ' Z'Z'AGCCZ'Z'Z'GZ'GG	62
2426-1388	GCAGCGZ'GACAZ'AZ'GAGGACZ'Z'GGGGZ' Z'Z'AGCCGZ'Z'GZ'GG	63
2426-1381	GCAGCGGGACACAZ'GAGGACZ'Z'GGGGZ' Z'Z'AGCCGZ'Z'GZ'AG	64
2426-1699	GZ'AGCGGGACACAZ'GAGGACZ'Z'GGGGZ' Z'Z'AACCGZ'Z'GZ'GG	65
2426-1702	GZ'AGCGGGACACAZ'GGGGACZ'Z'GGGGZ' Z'Z'AACCGZ'Z'GZ'GG	66
2426-1265	GAAGCGGGACACAZ'GAGGACZ'Z'GGGGZ' Z'Z'AACCGZ'Z'GZ'GG	67
2426-1374	GCAGCGGGACACAZ'GAGGACZ'Z'GAGGZ' Z'Z'AACCGZ'Z'GZ'GG	68
2426-1377	GCAGCGGGACACAZ'GAGGACZ'Z'GGGGZ' Z'Z'AACCGZ'Z'GZ'GG	69
2426-1384	GCAGCGGGACACAZ'GAGZ'ACZ'Z'GGGGZ' Z'AACCGZ'Z'GZ'GGC	70
2426-1622	GCAGCGGGACACAZ'GAGGACZ'Z'GGGGZ' Z'AACCGZ'Z'GZ'GGC	71
2426-1378	GCAGCGGGACACAZ'GAGGACZ'Z'GGGGZ' Z'Z'AACCGZ'Z'GZ'GZ'	72
2426-1266	GAAGCGGGACACAZ'GAGGACZ'Z'GGGGZ' Z'Z'AGCCGZ'Z'GZ'Z'G	73
2426-1537	GAAGCGGGACACAZ'GAGGACZ'Z'GGGGZ' Z'Z'AGCCGZ'Z'GZ'GG	74
2426-1355	GCAACGGGACACAZ'GAZ'GACZ'Z'GGGGZ' Z'Z'AGCCGZ'Z'GZ'GG	75
2426-1385	GCAGCGGGACACAZ'GAZ'GACZ'Z'Z'GGGGZ' Z'Z'AGCCGZ'Z'AZ'GG	76
2426-1701	GZ'AGCGGGACACAZ'GAZ'GACZ'Z'GGGGZ' Z'Z'AGCCGZ'Z'GZ'GG	77
2426-1458	GZ'AGCGGGACACAZ'GAGGACZ'Z'GGGGG Z'Z'AGCCGZ'Z'GCGG	78
2426-1700	GZ'AGCGGGACACAZ'GAGGACZ'Z'GGGGZ' Z'Z'AGCCGZ'Z'GZ'GG	79
2426-1386	GCAGCGGGGACACAZ'GAGGACZ'Z'GGGGZ' Z'Z'AGCCGZ'Z'GZ'GG	80
2426-1623	GCAGCGGGACACAZ'GAGGACZ'Z'GGGGZ' Z'Z'AGCAGZ'Z'AZ'GG	81
2426-1392	GCAGZ'GGGACACAZ'GAGGACZ'Z'GGGGZ' Z'Z'AGCCGZ'Z'AZ'GC	82
2426-1624	GCAGCGGGACACAZ'GAGGACZ'Z'GGGGZ' Z'Z'AGCCGZ'Z'AZ'GC	83
2426-1383	GCAGCGGGACACAZ'GAGGACZ'Z'GGGGZ' Z'Z'AGCCGZ'Z'GZ'GC	84
2426-1382	GCAGCGGGACACAZ'GAGGACZ'Z'GGGGZ' Z'Z'AGCCGZ'Z'GZ'GA	85
2426-1619	GCAGCCGGACACAZ'GAGZ'ACZ'Z'GGGGZ' Z'Z'AGCCGZ'Z'GZ'GG	86
2426-1389	GCAGCZ'GGACACACGAGGACZ'Z'GGGGZ'Z' Z'AGCZ'GZ'Z'GZ'GG	87
2426-1371	GCAGCAGGACACAZ'GAGGACZ'Z'GGGGZ' Z'Z'AGCCGZ'Z'GZ'GG	88

ES 2 610 159 T3

2426-1391	GCAGZ'AGGACACAZ'GAGGACZ'Z'GGGGZ' Z'Z'AGCCGZ'Z'GZ'GG	89
2426-1618	GCAGAGGGACACAZ'GAGGACZ'Z'GGGGZ' Z'Z'AGCCGZ'Z'GZ'GG	90
2426-1629	GCAGZ'GGGACACAZ'GAGGACZ'Z'GGGGZ' Z'Z'AGCCGZ'Z'GZ'GG	91
2426-1393	GCAGZ'GGGAZ'ACAZ'GAGGACGZ'Z'GGGG Z'Z'Z'AGCCGZ'Z'GZ'G	92
2426-1457	GZ'AGCGGGACACAZ'GAGGACGZ'Z'GGGG Z'Z'Z'AGCCGZ'Z'GZ'G	93
2426-1642	GGAGCGGGGCACAZ'GAGGACZ'Z'GGGGGZ Z'Z'AGCCGZ'Z'GZ'G	94
9999-1044	GCAGCGGGACACAZ'GAGGACZ'Z'GGGGGZ Z'Z'AGCCGZ'Z'GZ'G	95
2426-1628	GCAGCGGGACACZ'AZ'GAGGACZ'Z'GGGG Z'Z'Z'AGCCGZ'Z'GZ'	96
2426-1376	GCAGCGGGACACAZ'GAGGACZ'Z'GGGGZ' Z'Z'AACCGZ'Z'	97
2426-1379	GCAGCGGGACACAZ'GAGGACZ'Z'GGGGZ' Z'Z'AG	98
2426-1375	GCAGCGGGACACAZ'GAGGACZ'Z'GGGGGZ Z'Z'AGC	99
2426-1390	GCAGCZ'GGACACAZ'GAZ'GZ'ACGZ'Z'GGG GZ'Z'Z'AGCC	100
2426-1390	GCAGCZ'GGACACAZ'GAZ'GZ'ACGZ'Z'GGG GZ'Z'Z'AGCC	101
2426-1402	GGAACZ'AGCGZ'GGAZ'GGGGCZ'Z'GGGGZ' Z'Z'AGCCGZ'Z'AZ'GC	102
2426-1531	GAACZ'AGCGZ'GGAZ'GGGGCZ'Z'GGGGZ' Z'Z'AGCCGZ'Z'AZ'GC	103
2426-1401	GGAACZ'AGCGZ'GAZ'GGGGCZ'Z'GGGGZ' Z'Z'AGCCGZ'Z'AZ'GC	104
2426-1755	Z'GGAACZ'AGCGZ'GGAZ'GGGGCZ'Z'GGG Z'Z'Z'AGCCG Z'Z'AZ'G	105
2426-1404	GGAACZ'AGCGZ'GGAZ'GGGGCZ'Z'GGGG Z'Z'Z'AGCCAZ'Z'AZ'G	106
2426-1009	GGAACZ'AGCGZ'GGAZ'GGGGCZ'Z'GGGG Z'Z'Z'AGCCGZ'Z'AZ'G	107
2426-1403	GGAACZ'AGCGZ'GGAZ'GGGGCZ'Z'GGAG Z'Z'Z'AGCCGZ'Z'AZ'G	108
2426-1637	GGAACZ'AGCGZ'GGAZ'GGGGCZ'Z'GGGG Z'Z'Z'AACCGZ'Z'AZ'G	109
2426-1529	GAAACZ'AGCGZ'GGAZ'GGGGCZ'Z'GGGG Z'Z'Z'AGCCGZ'Z'AZ'G	110
2426-1638	GGAACZ'AGCGZ'GGAZ'GGGGCZ'Z'GGGG Z'Z'Z'AGCCGZ'Z'GZ'G	111
2426-1643	GGAGCZ'AGCGZ'GGAZ'GGGGACZ'Z'GGGG Z'Z'Z'AGCCGZ'Z'GZ'G	112
2426-1636	GGAACZ'AGCACGGAZ'GGGGCZ'Z'GGGG Z'Z'Z'AGCCGZ'Z'AZ'G	113
2426-1405	GGAACZ'AGCGZ'GGAZ'GGGGCZ'Z'GGGG Z'Z'Z'AZ'CCGZ'Z'AZ'A	114
2426-1406	GGAACZ'AGCGZ'GGAZ'GGGGCZ'Z'GGGZ' Z'AGZ'	115
2426-1364	GCAGAAZ'GCGGZ'AZ'AZ'GAGGACZ'Z'GGA GZ'Z'Z'AGCCGZ'Z'GZ'	116
2426-1365	GCAGAAZ'GCGGZ'AZ'AZ'GAGGACZ'Z'GGG GZ'Z'Z'AGCCGZ'Z'GZ'	117
2426-1366	GCAGAAZ'GCGGZ'AZ'AZ'GGGGACZ'Z'GGG GZ'Z'Z'GGCCGZ'Z'GZ'	118
2426-1617	GCAGAAZ'GCGGZ'AZ'AZ'GGGGCZ'Z'GGG GZ'Z'Z'AZ'CCGZ'Z'GZ'	119

ES 2 610 159 T3

2426-1367	GCAGAAZ'GCGGZ'AZ'AZ'GGGGGCZ'Z'GGG GZ'Z'Z'AGCCAZ'Z'GZ'	120
2426-1067	GCAGAAZ'GAGGZ'AZ'AZ'GAGGACZ'Z'GGG GZ'Z'Z'AGCCGZ'Z'GZ'	121
2426-1369	GCAGAAZ'GCGGZ'AZ'AZ'GGGGGCZ'Z'GGG GZ'Z'Z'AZ'CCGZ'Z'AZ'	122
2426-1368	GCAGAAZ'GCGGZ'AZ'AZ'GGGGGCZ'Z'GGG GZ'Z'Z'AGCCGZ'Z'AZ'	123
2426-1370	GCAGAAZ'GCGGZ'AZ'AZ'GGGGGCZ'Z'GG GZ'Z'Z'AGCCGZ'Z'AZ'	124
2426-1616	GCAGAAZ'GCGGZ'AZ'AZ'GGGGACZ'Z'GGG GGZ'Z'Z'AGCCGZ'Z'G	125
2426-1363	GCAGAAZ'GCGGZ'AZ'AGZ'GGGGGCZ'Z'GG GGZ'Z'Z'AGCCGZ'Z'A	126
2426-1519	Z'GCAGAAZ'GCGGZ'AZ'AZ'GGGGGCZ'Z'GG GGZ'Z'Z'AZ'CCG	127
2426-1156	GZ'GZ'CACZ'Z'GZ'GGGGAGZ'Z'GGGGZ'Z'GA Z'CCGZ'Z'GZ'CCGCC	128
2426-1743	GZ'GZ'CACZ'Z'GZ'GGGGAGZ'Z'GGGGZ'Z'GA Z'CCGZ'Z'GZ'Z'CGCC	129
2426-1514	GZ'GZ'CACZ'Z'GZ'GGGGAGZ'Z'GGGGZ'Z'GA Z'CCGZ'Z'GZ'Z'Z'CGZ'	130
2426-1513	GZ'GZ'CACZ'CGZ'GGGGAGZ'Z'GGGGZ'Z'GA Z'CCGZ'Z'GZ'Z'CGCZ'	131
2426-1742	GZ'GZ'CACZ'Z'GZ'GGGGAGZ'Z'GGGGZ'Z'GA Z'CCAAZ'GZ'Z'CGCZ'	132
2426-1744	GZ'GZ'CACZ'Z'GZ'GGGGAGZ'Z'GGGGZ'Z'GA Z'CCGZ'Z'GZ'Z'Z'CGC	133
2426-1157	GZ'GZ'CACZ'Z'GZ'GGGGAGZ'Z'Z'GGGGZ'Z'GZ AZ'CCGZ'Z'CGZ'Z'Z'C	134
2426-1094	GGCGACGCGCACAGZ'GGGGZ'AGZ'Z'GGG GZ'Z'Z'AACCGZ'Z'GZ'	135
2426-1417	GGCGACGCGCGCAZ'AGGGZ'AGZ'Z'GGGG Z'Z'Z'AACCGZ'Z'GZ'Z'C	136
2426-63	GCGACGCGCGCAZ'GGGGZ'AGZ'Z'GGGGZ' Z'Z'AACGGZ'Z'GZ'CG	137
2426-1038	GACCAACAZ'GAGGACZ'Z'GGGGZ'Z'Z'AGC CGZ'Z'GZ'GGCACAG	138
2426-1571	GACCAACAZ'GAGGACZ'Z'GGGGZ'Z'Z'AGC CGZ'Z'GZ'Z'GCACAG	139
2426-1100	GGGAAGCGAZ'AZ'GAGGACZ'Z'GGGG Z'Z'Z'AGCCGZ'Z'GZ'GGCA	140
2426-1419	GGGAAGCGAZ'AZ'GAGGAG Z'Z'GGGGZ'Z'Z'AZ'CCGZ'Z'GZ'CAAC	141
2426-1089	GGAGZ'AGGGAAAAZ'GGGGAGZ'Z'GGGGZ' Z'Z'AZ'CCGZ'Z'GZ'CA	142
2426-1064	GAZ'Z'GCZ'GGA GGA Z'GG GGAGZ'GGGG G Z'Z'Z'AZ'CCGZ'Z'GZ'CA	143
2426-1352	GAZ'Z'GCZ'GGAGGAZ'GGGGAGZ'Z'GGGGZ' Z'Z'AZ'CCGZ'Z'GZ'CA	144
2426-1198	GAZ'Z'GCZ'GGAGGAZ'GAGGACZ'Z'GGGGZ' Z'Z'AGCCGZ'Z'GZ'GG	145
2426-1073	GCCGGGGCCGCZ'AZ'GAGGACAZ'GGGGZ'Z' Z'AGCCGZ'Z'GZ'GG	146
2426-1068	GCAGAAZ'GCGAZ'AZ'AZ'GGGGGCZ'Z'GGG GZ'Z'Z'AGCCGZ'Z'AZ'	147
2426-1231	GGZ'GGCACACZ'GGZ'GGGGGCZ'Z'GGGG Z'Z'GAGCCGZ'Z'AZ'G	148
* Solo se muestra la región 40N		

Basándose en esto, como se ha señalado anteriormente, la secuencia de consenso para la unión a β -NGF se determinó que era la siguiente secuencia:

BAZGRGGRSZZGGGGZZZADCCGZZRZG (SEQ ID NO: 3)

en la que B, Z, R y S son las que se han definido anteriormente. Aunque la secuencia de consenso tiene 28 nucleótidos de longitud, varias de las secuencias listadas en la Tabla 2 tienen inserciones de bases únicas en este consenso. La Figura 2B indica aproximadamente un 91 por ciento de las secuencias que tienen una eliminación en la posición 12, pero aproximadamente un 7 por ciento de las secuencias tenían una G o Z en esta posición, y aproximadamente el 95 por ciento tenían una eliminación en la posición 19, pero aproximadamente el 3 por ciento tenía una G en esta posición. Esta observación sugiere inserciones en la secuencia de consenso β -NGF (SEQ ID NO: 3) se toleran en algunas posiciones y estas inserciones no inactivan el aptámero β -NGF.

Ejemplo 2. Estudios de truncado se secuencias

El aptámero β -NGF 2426-66 (SEQ ID NO: 1) tiene 76 nucleótidos de longitud con una $K_d = 5 \times 10^{-9}$. Para la mayoría de la síntesis química eficaz, es importante identificar una secuencia mínima de aptámero de alta afinidad y truncar el aptámero en el tamaño más pequeño posible. Otras ventajas son el aumento de penetración y la estabilidad contra la actividad de las nucleasas in vivo.

Con el fin de identificar la mínima región de aptámero 2426-66 (SEQ ID NO:1) que mantiene la afinidad de unión, se sintetizaron una serie de variantes truncadas que representaban todos las posibles secuencias de 50 nucleótidos contiguos presentes en 2426-66. Las secuencias de las variantes se enumeran en la Tabla 3, donde Z' representa BndU y T represente dT. Las variantes se ensayaron en cuanto a la afinidad por β -NGF en el ensayo de afinidad de unión como se ha descrito anteriormente.

Tabla 3. Secuencias de aptámero 24266 y variantes truncadas

Denominación de aptámeros	Secuencia (5' → 3')	SEQ ID NO:
2426-66 (76-mero)	GAGTGACCGTCTGCCTGCAGCGGGACACAZ'GA GGACZ'Z'GGGGZ'Z'Z'AGCCGZ'Z'GZ'GGCACAGA GAAGAAACAAGACC	1
2426-66-2 (50-mero)	GAGTGACCGTCTGCCTGCAGCGGGACACAZ'GA GGACZ'Z'GGGGZ'Z'Z'AGCCG	4
2426-66-3 (50-mero)	AGTGACCGTCTGCCTGCAGCGGGACACAZ'GAG GACZ'Z'GGGGZ'Z'Z'AGCCGZ'	5
2426-66-4 (50-mero)	GTGACCGTCTGCCTGCAGCGGGACACAZ'GAGG ACZ'Z'GGGGZ'Z'Z'AGCCGZ'Z'	6
2426-66-5 (50-mero)	TGACCGTCTGCCTGCAGCGGGACACAZ'GAGGA CZ'Z'GGGGZ'Z'Z'AGCCGZ'Z'G	7
2426-66-6 (50-mero)	GACCGTCTGCCTGCAGCGGGACACAZ'GAGGAC Z'Z'GGGGZ'Z'Z'AGCCGZ'Z'GT	8
2426-66-7 (50-mero)	ACCGTCTGCCTGCAGCGGGACACAZ'GAGGACZ 'Z'GGGGZ'Z'Z'AGCCGZ'Z'GZ'G	9
2426-66-8 (50-mero)	CCGTCTGCCTGCAGCGGGACACAZ'GAGGACZ'Z 'GGGGZ'Z'Z'AGCCGZ'Z'GZ'GG	10
2426-66-9 (50-mero)	CGTCTGCCTGCAGCGGGACACAZ'Z'GAGGACZ' Z'Z'GGGGZ'Z'Z'AGCCGZ'Z'GZ'GGC	11
2426-66-10 (50-mero)	GTCTGCCTGCAGCGGGACACAZ'GAGGACZ'Z'G GGGZ'Z'Z'AGCCGZ'Z'GZ'GGCA	12
2426-66-11 (50-mero)	TCTGCCTGCAGCGGGACACAZ'GAGGACZ'Z'GG GGZ'Z'Z'AGCCGZ'Z'GZ'GGCAC	13
2426-66-12 (50-mero)	CTGCCTGCAGCGGGACACAZ'GAGGACZ'Z'GGG GZ'Z'Z'AGCCGZ'Z'GZ'GGCACA	14
2426-66-13 (50-mero)	TGCCTGCAGCGGGACACAZ'GAGGACZ'Z'GGGG Z'Z'Z'AGCCGZ'Z'GZ'GGCACAG	15
2426-66-14 (50-mero)	GCCTGCAGCGGGACACAZ'GAGGACZ'Z'GGGGZ' Z'Z'AGCCGZ'Z'GZ'GGCACAGA	16
2426-66-15 (50-mero)	CCTGCAGCGGGACACAZ'GAGGACZ'Z'GGGGZ'Z' Z'AGCCGZ'Z'GZ'GGCACAGAG	17
2426-66-16 (50-mero)	CTGCAGCGGGACACAZ'GAGGACZ'Z'GGGGZ'Z' 'AGCCGZ'Z'GZ'GGCACAGAGA	18
2426-66-17 (50-mero)	TGCAGCGGGACACAZ'GAGGACZ'Z'GGGGZ'Z' AGCCGZ'Z'GZ'GGCACAGAGAA	19

2426-66-18 (50-mero)	GCAGCGGGACACAZ'GAGGACZ'Z'GGGGZ'Z'Z'A GCCGZ'Z'GZ'GGCACAGAGAAG	20
2426-66-19 (50-mero)	CAGCGGGACACAZ'GAGGACZ'Z'GGGGZ'Z'Z'AG CCGZ'Z'GZ'GGCACAGAGAAGA	21
2426-66-20 (50-mero)	AGCGGGACACAZ'GAGGACZ'Z'GGGGZ'Z'Z'AGC CGZ'Z'GZ'GGCACAGAGAAGAA	22
2426-66-21 (50-mero)	GCGGGACACAZ'GAGGACZ'Z'GGGGZ'Z'Z'AGCC GZ'Z'GZ'GGCACAGAGAAGAAA	23
2426-66-22 (50-mero)	CGGGACACAZ'GAGGACZ'Z'GGGGZ'Z'Z'AGCCG Z'Z'GZ'GGCACAGAGAAGAAAC	24
2426-66-23 (50-mero)	GGGACACAZ'GAGGACZ'Z'GGGGZ'Z'Z'AGCCGZ' Z'GZ'GGCACAGAGAAGAAACA	25
2426-66-24 (50-mero)	GGACACAZ'GAGGACZ'Z'GGGGZ'Z'Z'AGCCGZ'Z' GZ'GGCACAGAGAAGAAACAA	26
2426-66-25 (50-mero)	GACACAZ'GAGGACZ'Z'GGGGZ'Z'Z'AGCCGZ'Z'G Z'GGCACAGAGAAGAAACAAG	27
2426-66-26 (50-mero)	ACACAZ'GAGGACZ'Z'GGGGZ'Z'Z'AGCCGZ'Z'GZ' GGCACAGAGAAGAAACAAGA	28
2426-66-38 (50-mero)	CACAZ'GAGGACZ'Z'GGGGZ'Z'Z'AGCCGZ'Z'GZ'G GCACAGAGAAGAAACAAGAC	29
2426-66-39 (50-mero)	ACAZ'GAGGACZ'Z'GGGGZ'Z'Z'AGCCGZ'Z'GZ'GG CACAGAGAAGAAACAAGACC	30

Todas las variantes que mantienen la actividad de unión con β -NGF con la excepción de las variantes 2426-66-2 (SEQ ID NO: 4), 2426-66-3 (SEQ ID NO: 5), 2426-66-4 (SEQ ID NO: 6), 2426-66-5 (SEQ ID NO: 7), y 2426-66-6 (SEQ ID NO: 8), sugieren que los 26 nucleótidos del extremo 5' (posiciones 1-26) y los 21 nucleótidos del extremo 3' (posiciones 56-76) de 2426-66 no son necesarios para la unión con β -NGF, y todo o parte del elemento de 29 nucleótidos restantes (posiciones 27-55) pueden ser suficientes. Esta hipótesis se ensayó sintetizando y midiendo las afinidades de unión de una segunda serie de variantes de 2426-66 (SEQ ID NO: 1). Las secuencias de las variantes se enumeran en la Tabla 4, en las que Z' representan BndU y T representa dT. Todas las variantes mantenían la unión con β -NGF con la excepción de las variantes 2426-66-56 (SEQ ID NO: 150), 2426-66-57 (SEQ ID NO: 151), 2426-66-58 (SEQ ID NO: 152), y 2426-66-59 (SEQ ID NO: 153). La variante 2426-66-55 (SEQ ID NO: 149), un 25mero, era la secuencia más corta con afinidad de unión a β -NGF igual que el aptámero 2426-66 (SEQ ID NO: 1). La variante 2426-66-54 (SEQ ID NO: 44), un 26mero, tenía una afinidad por β -NGF ligeramente mejor que el aptámero de longitud completa 2426-66 (SEQ ID NO: 1) y se escogió para optimización adicional.

15

Tabla 4. Secuencias de variantes truncadas del aptámero 2426-66

Denominación de aptámeros	Secuencia (5' → 3')	SEQ ID NO:
2426-66-30 (40-mero)	TGCAGCGGGACACAZ'GAGGACZ'Z'GGGGZ'Z'Z'AGCCGZ'Z'GZ'G	31
2426-66-40 (39-mero)	GCAGCGGGACACAZ'GAGGACZ'Z'GGGGZ'Z'Z'AGCCGZ'Z'GZ'G	32
2426-66-41 (38-mero)	CAGCGGGACACAZ'GAGGACZ'Z'GGGGZ'Z'Z'AGCCGZ'Z'GZ'G	33
2426-66-42 (37-mero)	AGCGGGACACAZ'GAGGACZ'Z'GGGGZ'Z'Z'AGCCGZ'Z'GZ'G	34
2426-66-52 (36-mero)	GCGGGACACAZ'GAGGACZ'Z'GGGGZ'Z'Z'AGCCGZ'Z'GZ'G	35
2426-66-43 (35-mero)	CGGGACACAZ'GAGGACZ'Z'GGGGZ'Z'Z'AGCCGZ'Z'GZ'G	36
2426-66-44 (34-mero)	GGGACACAZ'GAGGACZ'Z'GGGGZ'Z'Z'AGCCGZ'Z'GZ'G	37
2426-66-45 (33-mero)	GGACACAZ'GAGGACZ'Z'GGGGZ'Z'Z'AGCCGZ'Z'GZ'	38
2426-66-46 (32-mero)	GACACAZ'GAGGACZ'Z'GGGGZ'Z'Z'AGCCGZ'Z'GZ'G	39
2426-66-47 (31-mero)	ACACAZ'GAGGACZ'Z'GGGGZ'Z'Z'AGCCGZ'Z'GZ'G	40
2426-66-48 (30-mero)	CACAZ'GAGGACZ'Z'GGGGZ'Z'Z'AGCCGZ'Z'GZ'G	41
2426-66-49 (29-mero)	ACAZ'GAGGACZ'Z'GGGGZ'Z'Z'AGCCGZ'Z'GZ'G	42
2426-66-50 (28-mero)	CAZ'GAGGACZ'Z'GGGGZ'Z'Z'AGCCGZ'Z'GZ'G	2
2426-66-53 (27-mero)	AZ'GAGGACZ'Z'GGGGZ'Z'Z'AGCCGZ'Z'GZ'G	43
2426-66-54 (26-mero)	Z'GAGGACZ'Z'GGGGZ'Z'Z'AGCCGZ'Z'GZ'G	44
2426-66-55 (25-mero)	GAGGACZ'Z'GGGGZ'Z'Z'AGCCGZ'Z'GZ'G	149
2426-66-56 (24-mero)	AGGACZ'Z'GGGGZ'Z'Z'AGCCGZ'Z'GZ'G	150
2426-66-57 (23-mero)	GGACZ'Z'GGGGZ'Z'Z'AGCCGZ'Z'GZ'G	151
2426-66-58 (22-mero)	GACZ'Z'GGGGZ'Z'Z'AGCCGZ'Z'GZ'G	152

2426-66-59 (21-mero)	ACZ'Z'GGGGZ'Z'Z'AGCCGZ'Z'GZ'G	153
----------------------	-------------------------------	-----

Ejemplo 3. Determinación de las posiciones BndU deseables

Sustitución única de 26-mero de BndU a dT

Nueve de los 26 nucleótidos del aptámero 2426-66-54 (SEQ ID NO: 44) son BndU. Para determinar que posiciones BndU están implicadas en la unión, se sintetizaron nueve variantes de 2426-66-54 que contenía cada una única sustitución dT en una de las nueve posiciones de BndU y se midieron las afinidades para β -NGF. Las secuencias de las variantes se enumeran en la Tabla 5 en las que Z' representa BndU y T representa dT.

Tabla 5. Secuencias de variantes de aptámero 2426-66-54

Designación de aptámero	Posición de sustitución	Secuencia (5'→3')	SEQ ID NO:
2426-66-54	ninguna	Z'GAGGACZ'Z'GGGGZ'Z'Z'AGCCGZ'Z'GZ'G	44
2426-66-66	1	TGAGGACZ'Z'GGGGZ'Z'Z'AGCCGZ'Z'GZ'G	156
2426-66-67	8	Z'GAGGACTZ'GGGGZ'Z'Z'AGCCGZ'Z'GZ'G	157
2426-66-68	9	Z'GAGGACZ'TGGGGZ'Z'Z'AGCCGZ'Z'GZ'G	158
2426-66-69	14	Z'GAGGACZ'Z'GGGGTZ'Z'AGCCGZ'Z'GZ'G	159
2426-66-70	15	Z'GAGGACZ'Z'GGGGZ'TZ'AGCCGZ'Z'GZ'G	160
2426-66-71	16	Z'GAGGACZ'Z'GGGGZ'Z'TAGCCGZ'Z'GZ'G	161
2426-66-72	22	Z'GAGGACZ'Z'GGGGZ'Z'Z'AGCCGTZ'GZ'G	162
2426-66-73	23	Z'GAGGACZ'Z'GGGGZ'Z'Z'AGCCGZ'TGZ'G	163
2426-66-74	25	Z'GAGGACZ'Z'GGGGZ'Z'Z'AGCCGZ'Z'GTG	164

La sustitución de BndU con dT en la posición 9 (variante 2426-66-68, SEQ ID NO: 158) y la posición 16 (variante 2426-66-71, SEQ ID NO: 161) no mostraba pérdida de afinidad para β -NGF en comparación con al aptámero sin sustituir (todo BndU) 2426-66-54 (SEQ ID NO: 44). La sustitución BndU con dT en la posición 1 (variante 2426-66-66, SEQ ID NO: 156), posición 8 (variante 2426-66-67, SEQ ID NO: 157) y posición 15 (2426-66-69, SEQ ID NO: 159) mostraba una pérdida parcial de afinidad y la sustitución en la posición 15 (2426-66-70, SEQ ID NO: 160), posición 22 (2426-66-72, SEQ ID NO: 162), posición 23 (2426-66-73, SEQ ID NO: 163) y posición 25 (2426-66-74, SEQ ID NO: 164) mostraban una pérdida total de afinidad. Estos resultados indican que los restos de uridina modificados en las posiciones 1, 8, 14, 15, 22, 23 y 25 son deseables para la máxima afinidad para β -NGF.

Las variantes truncadas de 2426-66 (SEQ ID NO: 1) con restos BndU en las posiciones 9 y 16 sustituidos con dT se sintetizaron y ensayaron en cuanto a la afinidad para β -NGF. Las secuencias se enumeraron en la Tabla 6 en la que Z' representa BndU y T representa dT. La sustitución de BndU con dT en las dos posiciones no mostraba pérdida de afinidad en comparación con los controles sin sustituir para cualquiera de las tres variantes.

Tabla 6. Variantes truncadas y sustituidas del aptámero 2426-66

Denominación de aptámero	Posiciones de sustitución	Secuencia (5'→3')	SEQ ID NO:
2426-66-75 (28-mero)	11, 18	CAZ'GAGGACZ'TGGGGZ'Z'TAGCCGZ'Z'GZ'G	166
2426-66-76 (27-mero)	10, 17	AZ'GAGGACZ'TGGGGZ'Z'TAGCCGZ'Z'GZ'G	167
2426-66-77 (26-mero)	9, 16	Z'GAGGACZ'TGGGGZ'Z'TAGCCGZ'Z'GZ'G	168

Basándose en estos resultados, que se resumen en la Figura 2A, la secuencia de consenso (SEQ ID NO: 3) para la unión a β -NGF se modificó de la siguiente manera para reflejar la capacidad de sustituir dT por BndU en dos posiciones:

BAZGRGGRSZWGGGGZZWADCCGZZRZG (SEQ ID NO: 45)

donde Z, R, S, Z y W son como se ha definido anteriormente.

Ejemplo 4. Ensayos celulares

El aptámero β -NGF 2426-66 (SEQ ID NO: 1) y las variantes truncadas de 2426-66 se exploraron por la inhibición de la actividad de β -NGF en dos ensayos celulares in vitro. Las células PC12 (CRL-1721 de la ATCC), una línea celular cancerosa de un feocromocitoma de rata y un modelo de diferenciación neuronal, respondían a la β -NGF por inducción del fenotipo neuronal. Dos manifestaciones de esa respuesta eran la fosforilación de TrkA unido a la membrana y la extensión de neuritas. Los aptámeros se ensayaron en cuanto a su capacidad para inhibir la fosforilación de TrkA estimulada por β -NGF y el crecimiento de neuritas de las células PC12.

10 Ensayos de crecimiento de neuritas

Las células PC12 se colocaron en placas con baja densidad en placas de 60 mm y se dejó que se fijaran a la placa durante una noche. Tras la fijación, se substituyó el medio de crecimiento normal con medio bajo en suero (LSM), ya que las células PC12 no se diferencian en medio de crecimiento normal alto en suero. Se pre-mezclaron β -NGF (100 ng/ μ l) y aptámero (100 nM) en LSM y se permitió que se equilibraran durante una hora, y luego se añadieron a las placas a concentraciones finales de 10 ng/ μ l de β -NGF (0,38 nM) y 10 nM de aptámero. Se permitió que las células se incubaran durante tres días, y el tercer día, los medios, β -NGF y el aptámero se substituyeron como anteriormente. El día 5, se capturaron imágenes de las células con un microscopio de contraste de fase, y se midió la longitud de neuritas utilizando el neuronJ conectado para ImageJ (programa NIH). La longitud de neurita/célula se calculó y normalizó a n valor de 100 para la muestra de control sin aptámero (con respecto al crecimiento de neurita).

La capacidad de los aptámeros para inhibir la diferenciación inducida por β -NGF humana de las células PC12 se ensayó en el ensayo de crecimiento de neurita. Los aptámeros se sintetizaron con una amidita dT invertida (3'-idT) en el extremo 3' para proporcionar la resistencia a 3'-5' exonucleasas presentes en el medio de cultivo (véase la Figura 5).

El aptámero 2426-66 (SEQ ID NO: 1) y la variante truncada 24266-66-50 (SEQ ID NO: 2) inhibían eficazmente el crecimiento de neurita inducido por β -NGF. Las variantes 2426-66-53 (SEQ ID NO: 43), 2426-66-54 (SEQ ID NO: 44) y 2426-66-50, que indicaban una longitud mínima de aptámero de 28 nucleótidos era necesaria para la inhibición máxima. La variante 2426-66-55 (SEQ ID NO: 149) eran menos eficaces para inhibir el crecimiento de neuritas mediado por β -NGF que 2426-66-50 indicando que una longitud mínima de aptámero de 28 nucleótidos era necesaria para la inhibición máxima. La variante 2426-66-75 (SEQ ID NO: 166) en la que los restos BndU en las posiciones 11 y 18 de 2426-66-50 se substituyeron con restos dT, tampoco era eficaz para bloquear el crecimiento de neuritas mediado por β -NGF. La variante 2426-66-3 (SEQ ID NO: 5), un 50-mero con baja afinidad para β -NGF, mostraba una pequeña inhibición del crecimiento de neuritas mediado por β -NGF.

La eficacia del aptámero en la inhibición del crecimiento de neuritas mediado por β -NGF se determinó midiendo el crecimiento relativo de neuritas a concentraciones de aptámero que varían desde 0,5 nM a 8,0 nM y calculando la concentración inhibitoria máxima de la mitad (CI_{50}) utilizando un ajuste a la curva no lineal (respuesta a la dosis sigmoidea con pendiente variable) (véase la Figura 6). El aptámero 2426-66 (SEQ ID NO: 1) presentaba una $CI_{50} = 2 \times 10^{-9}$ M, y la variante truncada 2426-66-50 (SEQ ID NO: 2) presentaba una $CI_{50} = 1 \times 10^{-9}$ M en este ensayo.

El aptámero 2426-66 (SEQ ID NO: 1) y las variantes truncadas 2426-66-50 (SEQ ID NO: 2) y 2426-66-53 (SEQ ID NO: 43) se ensayaron en cuanto a la inhibición de β -NGF de ratón y β -NGF de rata en el ensayo de crecimiento de neuritas. Los tres inhibían el β -NGF de ratón casi tan eficazmente como al β -NGF humano, e inhibía el β -NGF de rata con menor extensión (véase la Figura 7).

Ensayo de fosforilación TrkA

El β -NGF se une al receptor TrkA en la superficie de las células PC12, induciendo la dimerización y auto-fosforilación del receptor. El ensayo de fosforilación TrkA examina el estado de fosforilación de TrkA 10 minutos después del tratamiento con β -NGF que se ha pre-equilibrado con el aptámero. Mientras que el ensayo de crecimiento de neuritas es un ensayo terminal, mirando desde el punto final de la estimulación de β -NGF, el ensayo de fosforilación de TrkA es una instantánea de los eventos de señalización inmediata después de la estimulación con β -NGF.

Se sembraron las células PC12 en placas de 100 mm y se permitió que se fijaran durante una noche. Tras la fijación, se cambió el medio a LSM. Las células se dejaron en LSM durante una noche, y entonces se trataron durante 10 minutos con solo β -NGF (10 ng/ μ l de concentración final, o 0,38 nM), con β -NGF con inhibidor de fosforilación de TrkA K252a (0,2 μ M), y con β -NGF pre-equilibrado con aptámero a 10 nM de concentración final. Las células se recolectaron, se lisaron y el TrkA se inmunoprecipitó a partir del lisado aclarado con un anticuerpo Trk total (TrkA es el único receptor Trk que se expresa en las células PC12). El inmunoprecipitado se ejecutó en un gel SDS-PAGE, se electro-transfirió en una membrana PVDF, y se sondeó con un anticuerpo TrkA para cuantificar la cantidad de TrkA total. El porcentaje de fosforilación de TrkA (relación de TrkA fosforilado / TrkA total) se calculó para cada muestra y se normalizó respecto a un valor de 199 para el control sin aptámero. Los resultados se exponen en la Figura 8.

El aptámero 2426-66 (SEQ ID NO: 1) y las variantes truncadas 2426-66-50 (SEQ ID NO: 2) y 2426-66-3 (SEQ ID NO: 5) se ensayaron en cuanto a la inhibición de la fosforilación de TrkA por el β -NGF humano. El aptámero 2426-66 y la

variante truncada 2426-66-50 inhibían eficazmente la fosforilación de los receptores TrkA inducida por β -NGF. La variante 2426-66-3, un 50mero con baja afinidad por β -NGF, mostraba poca inhibición de fosforilación de TrkA por β -NGF.

5 La variante 2426-66-50 (SEQ ID NO: 2) se ensayó en cuanto a la inhibición del β -NGF de ratón y β -NGF de rata en el ensayo de fosforilación de TrkA. Los resultados se exponen en la Figura 9. La variante 2426-66-50 inhibía eficazmente tanto la fosforilación inducida por β -NGF de ratón como por β -NGF de rata.

Ejemplo 5. Tratamiento con aptámero de dermatitis atópica en un sistema de modelo de ratón

10 Ratones NC/NgaTnd endogámicos criados en circunstancias no estériles (convencionales) desarrollan espontáneamente lesiones de piel similares a las lesiones de dermatitis atópica en seres humanos y son un modelo establecido para la investigación de tratamientos para dermatitis atópica (Matsuda et al., Int. Immunol. 9:461, 1997). El siguiente estudio se diseñó para evaluar la capacidad de los aptámeros neutralizantes de β -NGF para reducir o eliminar las manifestaciones clínicas de dermatitis atópica in vivo en este modelo de ratón.

15 Los ratones NC/NgaTnd se mantuvieron en circunstancias sin control de aire a 20-26 °C con un ciclo de 12 horas día/noche, y tenían acceso a comida convencional y agua ad libitum. Los ratones a la edad de 8-10 semanas que manifestaron lesiones cutáneas leves (fenotipo de enfermedad) se utilizaron en este estudio. Los ratones NC/NgaTnd se mantuvieron en condiciones libres de patógenos específicos (SPF) y los que no presentaban signos o síntomas clínicos de dermatitis atópica (fenotipo no enfermo) se utilizaron como controles.

20 Se preparó el ungüento hidrófilo (HO) de acuerdo con la farmacopea japonesa (un 25 % de vaselina blanca, un 20 % de alcohol estearílico, un 12 % de propilenglicol, un 4 % de aceite de ricino hidrogenado polioxitileno 60, un 1 % de monoestearato de glicerilo, un 0,1 % de parahidroxibenzoato de metilo, un 0,1 % de parahidroxibenzoato de propilo). Se preparó el aptámero en el HO fundiendo 20 g de HO en un baño de agua a 85 °C, añadiendo 20 g de un 2 % de aptámero en agua, y mezclando en un baño de agua enfriada con hielo hasta que se enfrió.

30 Los ratones se dividieron en cuatro grupos. El grupo 1 contenía 7 ratones con dermatitis, sin tratar. El grupo 2 contenía 7 ratones con dermatitis, tratados con HO. El grupo 3 contenía 7 ratones con dermatitis tratados con el aptámero 2426-66-50 (SEQ ID NO: 2) con un 3'-idT (un 1 % p/v en HO). El grupo 4 contenía 7 ratones SPF normales, sin tratar. Los ratones del grupo 2 y 3 se trataron una vez diariamente durante cuatro semanas aplicando 100 mg de muestra en las áreas dorsales afectadas. Una vez cada semana durante cuatro semanas (los días 0, 7, 14, 21, 28) se cuantificaron el comportamiento de rascado y la valoración de la condición clínica de la piel.

35 Se cuantificó el comportamiento de rascado espontáneo utilizando un sistema SCLABA-Real (Scratch Counting for LABo-ratory Animals, Noveltec Inc., Kobe, Japón) (Hattori et al., J. Immunol. 184:2729, 2010). Los ratones se colocaron en el instrumento SCLABA 30 minutos antes de la medición para permitirles adaptarse al nuevo ambiente, y se contaba el número de rascados durante una hora en una cámara de observación. Se hizo el recuento de una serie de comportamientos de rascado, comenzando por el estiramiento de la pata trasera hacia la cabeza, cara o lomo y terminación con retirado de la garra, como un episodio de rascado.

45 La puntuación de la afección clínica de la piel se determinó de acuerdo con el criterio descrito en Matsuda et al., Int. Immunol. 9:461, 1997. Los puntos de observación eran 1) prurito/picor, 2) eritema/hemorragia, 3) edema, 4) excoriación/erosión, y 5) escamas/sequedad. Las puntuaciones de cada punto de observación se clasificaron como 0 (ninguno), 1 (leve), 2 (moderado), y 3 (grave). La puntuación de la afección clínica cutánea era la suma de cinco puntuaciones de los puntos de observación.

50 La Figura 11 ilustra el cambio en la frecuencia de rascado de cada grupo de tratamiento, representado como medias con barras de error estándar. La frecuencia de rascado disminuía constantemente desde el día 14-28 para el grupo 3 (tratamiento con aptámero), pero no presentaba cambios en la frecuencia pasados los 28 días en los grupos 1 (sin tratamiento) y 2 (tratamiento con HO). La frecuencia de rascado del grupo 4 (ratones normales SPF) era muy bajo (datos no mostrados). La Figura 12 ilustra el cambio de la puntuación de la afección clínica cutánea para cada grupo de tratamiento, representada como de medias con barras de error estándar. La puntuación de la afección cutánea disminuía constantemente desde el día 14-28 en el grupo 3 (tratamiento con aptámero), pero no mostraba cambios pasados los 28 días para los grupos 1 (sin tratamiento) y 2 (tratamiento con HO). La puntuación de afección cutánea del grupo 4 (ratones SPF normales) era muy baja (datos no mostrados).

60 Las realizaciones y ejemplos anteriores se pretende que solo sean ejemplos. Ninguna realización, ejemplo o elemento particular de una realización o ejemplo en particular se tiene que considerar como crítico, necesario o elemento o característica esencial de cualquiera de las reivindicaciones. Además, ningún elemento descrito en el presente documento es necesario para la práctica de las reivindicaciones adjuntas a menos de que se describa expresamente como "esencial" o "crítico". Se pueden hacer varias alteraciones, modificaciones, sustituciones, y otras variaciones a las realizaciones desveladas sin apartarse del alcance de la presente invención, que se define en las reivindicaciones adjuntas. La memoria descriptiva, incluyendo las figuras y ejemplos, se consideran de manera ilustrativa, mejor que restrictiva, y todas dichas modificaciones y sustituciones se pretende que estén incluidas en el alcance de la invención. En consecuencia, el alcance de la invención se debería determinar por las reivindicaciones

adjuntas y sus equivalentes legales, más que por los ejemplos que se dan anteriormente. Por ejemplo, as etapas mencionadas en cualquiera de los métodos o procesos reivindicados se pueden ejecutar en cualquier orden factible y no se limita al orden presentado en cualquiera de las realizaciones, los ejemplos, o las reivindicaciones.

Complejo de demencia por SIDA	Enfermedad de Crohn	Neumonitis Intersticial	Prurito
Síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA)	Hepatitis autoinmunitaria criptogénica	Exposición a radiación ionizante	Psoriasis
Síndrome de inmunodeficiencia adquirida	Alveolitis fibrosante criptogénica	Iridociclitis/uveítis/ neuritis óptica	Psoriasis tipo 1
Anemia perniciosa adquirida	Sepsis de cultivo negativo	Síndrome de colon Irritable	Psoriasis tipo 2
Acrocianosis	Fibrosis quística	Lesiones por Isquemia-reperusión	Artritis Psoriásica
Dolor agudo y crónico (diferentes formas de dolor)	Trastornos asociados a terapia con citocinas	Choque isquémico	Artropatía Psoriásica
Dolor agudo y crónico asociado a enfermedad infecciosa (bacteriana o vírica)	Síndromes de desafeerencia	Artritis Juvenil crónica	Fibrosis Pulmonar
Enfermedad inmunitaria aguda asociada a trasplante de órganos	Demencia pugilística	Anemia perniciosa Juvenil	Hipertensión pulmonar secundaria a enfermedad el tejido conjuntivo
Leucemia Aguda	Enfermedad desmielinizante	Artritis reumatoide Juvenil	Manifestación pulmonar de poliarteritis nodosa
Leucemia linfoblástica Aguda (ALL)	Fiebre hemorrágica del Dengue	Atrofia muscular espinal Juvenil	Fibrosis por Radiación
Leucemia mieloide Aguda (AML)	Dolor Dental	Sarcoma de Kaposi	Radioterapia
Enfermedad inmunitaria Aguda o crónica asociada a trasplante de órganos	Dermatitis	Enfermedad de Kawasaki	Fenómeno y enfermedad de Rainaud
Pancreatitis Aguda	Dermatitis con escleroderma	Rechazo de trasplante de riñón	Artritis Reactiva
Fallo renal Agudo	Afección Dermatológica	Legionela	Enfermedad de Refsum
Fiebre reumática Aguda	Enfermedades Dermatológicas	Leishmaniosis	Taquicardia de complejo QRS Regular estrecho
mielitis transversal Aguda	Enfermedad pulmonar asociada a dermatomiositis / polimiositis	Lepra	Enfermedad de Reiter
Enfermedad de Addison	Diabetes	Lesiones del sistema corticoespinal	Enfermedad Renal NOS
Adenocarcinomas	Diabetes mellitus	Enfermedad de IgA Linear	Enfermedades Renales

ES 2 610 159 T3

Síndrome de dificultad respiratoria del Adulto (aguda)	Enfermedad arterioesclerótica del Diabético	Lipedema	Hipertensión Renovascular
Latidos ectópicos aéreos	Neuropatía diabética	Rechazo de trasplante de hígado	Lesiones por Reperusión
Hepatitis inducida por Alcohol	Enfermedad difusa de cuerpos de Lewy	Lupus	Lesiones por reperusión tras un trasplante de órganos
Daño hepático inducido por alcohol	Cardiomiopatía dilatada	Artritis de Lyme	Cardiomiopatía restrictiva
Cirrosis Alcohólica	Cardiomiopatía dilatada congestiva	Enfermedad de Lyme	Degeneración Retiniana
Enfermedades Alérgica y atópica	lupus Discoide eritematoso	Linfoderma	Síndrome de Rett
Conjuntivitis Alérgica	Trastorno del ganglio basal	Enfermedad pulmonar linfocítica infiltrativa	Enfermedades Reumáticas
Dermatitis Alérgica de contacto	Coagulación intravascular diseminada	Malaria	Artritis Reumatoide
Enfermedades Alérgicas	Alteraciones de la motilidad visceral respiratoria	Infertilidad masculina idiopática o NOS	Artritis Reumatoide asociada a enfermedad pulmonar intersticial
Rinitis Alérgica	Síndrome de Down en edad media	Enfermedades Malignas	Espondilitis Reumatoide
Reacciones Alérgicas de la piel	Sensibilidad farmacológica	Linfoma Maligno	Sarcoidosis
Alergia y asma	Hepatitis inducida por fármacos	Histiocitosis Maligna	Sarcomas
Rechazo de injertos	Enfermedad pulmonar intersticial inducida por fármacos	Melanoma Maligno	Síndrome de Schmidt
Alopecia	Trastornos del movimiento inducidos por fármacos que bloquean los receptores de dopamina del SNC	Trastorno de Memoria	Escleroderma
Alopecia areata	Úlceras Duodenales	Meningitis	Neuropatía ciática
Deficiencia de antitripsina Alfa-1	Dismenorrea	Meningococcemia	Demencia Senil de tipo cuerpos de Lewy
Enfermedad de Alzheimer	Dispepsia	Trastornos Mentales (por ejemplo, depresión y esquizofrenia)	Corea Senil
Esclerosis Amiotrófica lateral	Eczema	Enfermedades Metabólicas e idiopáticas	Síndrome séptico
Anemia	Encefalomiелitis	Metabólica/idiopática	Artritis Séptica
Angina pectoris	Endocarditis	vasculitis Microscópica del riñón	Choque séptico
Espondilitis Anquilosante asociada a enfermedad pulmonar	Endocrinopatía	Migraña	Artropatía Seronegativa

Degeneración celular del cuerno Anterior	Sinovitis Enteropática	Trastorno Mitocondrial multi-sistémica	Choque
Terapia Anti cd3	Epilepsia	Enfermedad mixta de tejido conjuntivo	Anemia de células falciforme
Reacciones Anti-receptor de hipersensibilidad	Epiglotitis	Enfermedad mixta de tejido conjuntivo asociada a enfermedad pulmonar	Enfermedad de Sjögren asociada a enfermedad pulmonar
Citotoxicidad mediada por anticuerpos	Daño o disfunción del tejido epitelial	Síndromes vasculares mixtos o no vasculares	Síndrome de Sjögren
síndrome Antifosfolípido	Infección por virus de Epstein-barr	Gammapatía Monoclonal	Rechazos de injerto de piel
Aneurismas aórtico o periférico	Eritromelalgia	Mieloma Múltiple	Síndrome de cambios cutáneos
Diseccción aórtica	Trastornos Extrapiramidales y cerebelosos	Esclerosis Múltiple (todos los subtipos)	Molestias de la piel con componente inflamatorio
Hipertensión Arterial	Enfermedad de Paget extramamaria	Degeneración múltiple sistémica (Mencel Dejerine-Tomas Shi-Drager y Machado-Josef)	Rechazo de trasplante de intestino delgado
Arteriosclerosis	Linfocitosis hematofagocítica Familiar	Encefalitis miálgica/enfermedad Royal Free	Patologías de tumores Sólidos y líquidos
Fístula Arteriovenosa	Infertilidad femenina	Miastenia gravis	Tumores Sólidos
Artritis	Rechazo de implante de timo Fetal	Micobacterium avium intracelular	Arritmias específicas
Artropatía	Fibromialgia	Micobacterium tuberculosis	Autoinmunidad espermática
Astenia	Fibrosis	Síndrome Mielodisplásico	Ataxia espinal
Asma	Enfermedad pulmonar fibrótica	Infarto de Miocardio	Degeneraciones espinocerebelosas
Ataxia	Ataxia de Friedreich	Trastornos isquémicos miocárdicos	Espondiloartropatía
Enfermedad Ateromatosa / arteriosclerosis	Trastornos de las funciones arteriales periféricas	Miositis	Esporádica
Aterosclerosis	Sepsis Fúngica	Dolor relacionado con β -NGF e hiperalgesia	Enfermedad de Still
Alergia Atópica	Gangrena Gaseosa	Carcinoma Nasofaríngeo	Miositis estreptocócica
Dermatitis Atópica	Úlcera Gástrica	Enfermedad pulmonar crónica Neonatal	Choque
Fibrilación auricular (sostenida o paroxística)	Reflujo Gastroesofágico	Nefritis	Lesiones estructurales del cerebelo
Flutter Atrial	Regiones Gastrointestinal o vascular	Nefrosis	Panencefalitis esclerosante Subaguda
Bloqueo auriculoventricular	Trastornos gastrointestinales Generales	Síndrome Nefrótico	Quemadura solar

Hipotiroidismo Atrófico autoinmunitario	Dolor de cabeza general	Neuritis	Dolor quirúrgico
Enfermedad bullosa autoinmunitaria	Inflamación General	Enfermedades Neurodegenerativas	Oftalmia Simpática
Enfermedades Autoinmunitarias	Genitourinarias	Atrofias neurogénicas y musculares	Dolor mantenido simpáticamente
Anemia hemolítica Autoinmunitaria	Arteritis de células gigantes	Enfermedades Neurológicas	Síncope
Hepatitis Autoinmunitaria	Nefritis Glomerular	Dolor Neuropático	Sífilis del sistema cardiovascular
Hipoglucemia mediada autoinmunitaria	Hipotiroidismo gotoso autoinmunitario (enfermedad de Hashimoto)	Dolor Neuropático e hiperalgesia y alodinia asociadas	Anafilaxia Sistémica
Neutropenia Autoinmunitaria	Síndrome de Goodpasture	Dolor Neuropático e hiperalgesia y alodinia asociadas	Síndrome de respuesta Sistémica inflamatoria
Trombocitopenia Autoinmunitaria	Artritis de gota	Fiebre Neutropénica	Lupus eritematoso Sistémico
Enfermedad Autoinmunitaria de tiroides	Rechazo de injertos de cualquier órgano o tejido	Esteatohepatitis Non-alcohólica	Enfermedad pulmonar asociada a lupus eritematoso Sistémico
Linfoma de linfocitos B	Glaucoma	linfoma No-hodgkin	Artritis reumatoide sistémica de aparición juvenil
Rechazo de injerto óseo	Sepsis Gram negativa	Enfermedad Obstétrica y ginecológica	esclerosis sistémica
Rechazo de trasplante de médula ósea (BMT)	Sepsis Gram positive	Oclusión de aorta abdominal y sus ramificaciones	Enfermedad pulmonar intersticial asociada a esclerosis sistémica
Trastornos Bronquiales	Granulomas debidos a organismos intracelulares	Trastornos arteriales Oclusivos	Todos los linfocitos T o FAB
Bronquiolitis obliterante	Enfermedad de Grave	Terapia con Okt3	Enfermedad/arteritis de Takaiasu
Bloqueo del haz	Infección por estreptococos del grupo B (GBS)	Enfermedades oftalmológicas	Telangiectasia
Linfoma de Burkitt	VIH	Orquitis/epididimitis	Jaqueca por tensión
Quemaduras	Neuropatía por VIH	Orquitis/ Procedimientos reversibles de vasectomía	Enfermedades mediadas Tipo T2 y Tipo T1
Caquexia	Enfermedad pulmonar asociada a Hemosiderosis	Rechazo de trasplante de órganos	Síndrome de Dolor Talámico
Cáncer	Leucemia de células pilosas	Organomegalia	Tromboangitis obliterante
Arritmias Cardiacas	Enfermedad de Hallerrorden-Spatz	Osteoartritis	Trombocitopenia

ES 2 610 159 T3

Síndrome Cardíaco stun	Tiroiditis de Hashimoto	Osteoartrosis	Tiroiditis
Tumores cardiacos	Fiebre del heno	Osteoporosis	Síndrome de choque Toxico
Cardiomiopatía	Fallo cardíaco	Enfermedades de inflamación de vías aéreas	Toxicidad
Respuesta inflamatoria a una derivación Cardiopulmonar	Rechazo de trasplante cardíaco	Fallo Ovárico	Toxinas
Afecciones Cardiovasculares	Hematocromatosis	Síndrome POEMS (polineuropatía, organomegalia, endocrinopatía, gammapatía monoclonal, y síndrome de cambios cutáneos)	Toxinas y quimioterapia
Carditis	Abetalipoproteinemia de cánceres Hematopoyéticos (leucemia y linfoma)	Dolor	Enfermedades de rechazo de trasplantes
Rechazo de trasplante de Cartilago	Hemodiálisis	Dolor por amputación o abscesos	Trasplantes
Causalgia	Anemia Hemolítica	Dolor por traumatismo	Traumatismo/ hemorragia
Degeneraciones Cerebelosas corticales	síndrome urémico Hemolítico / púrpura trombolítica trombocitopénica, hemorrágica	Rechazo de trasplante de Páncreas	Neuralgia del Trigémino
Trastornos Cerebelosos	Púrpura de Henoch- Schoenlein	Carcinoma Pancreático	Acantosis nigricans con resistencia a la insulina Tipo B
Taquicardia auricular caótica o multifocal	Hepatitis A	Pancreatitis	Reacciones de hipersensibilidad Tipo III
Quimioterapia	Hepatitis B	Síndrome Paraneoplásico /hipercalcemia de cáncer	Hipersensibilidad Tipo IV
Infarto Cerebral	Hepatitis C	Enfermedades Parasitarias	Hepatitis autoinmunitaria Tipo-1 (hepatitis clásica autoinmunitaria o lupoide)
Clamidas	Herpes simple	Rechazo de trasplante de Paratiroides	Hepatitis autoinmunitaria Tipo-2 (hepatitis con anticuerpos anti-LKM)
Colestasis	Arritmias del haz de His	Enfermedad de Parkinson	Artropatía cólica Ulcerativa
leucemia mielocítica Crónica (CML)	Enfermedad de Hodgkin	Enfermedad inflamatoria Pélvica	Colitis Ulcerativa
Hepatitis Crónica activa	Corea de Huntington	Penfigoide	Angina inestable

Alcoholismo crónico	Trastorno de movimiento hiperkinético	Pénfigo foliáceo	Uremia
Neumonía eosinofílica crónica	Reacciones de Hipersensibilidad	Pemfigus vulgaris	Urosepsis
Síndrome de fatiga crónica	Neumonitis por Hipersensibilidad	Rinitis Perenne	Urticaria
Enfermedad inmunitaria crónica asociada a trasplante de órganos	Hipertensión	Enfermedad Pericárdica	Uveitis
Afecciones inflamatorias crónicas	Hipertiroidismo	Enfermedad aterosclerótica periférica	Enfermedades Valvulares cardiacas
Dolor inflamatorio crónico o dolor neuropático	Trastorno de movimiento hipocinético	Trastornos vasculares periféricos	Venas varicosas
Patologías inflamatorias crónicas	Hipoglucemia	Peritonitis	Enfermedad pulmonar vasculítica difusa
Enfermedades hepáticas crónicas	Hipoparatiroidismo	Anemia Perniciosa	Vasculitis
leucemia linfocítica crónica (CLL)	Evaluación del eje Hipotalámico-hipofisario-adrenal	Uveítis Facogénica	Rinitis Vasomotora o alérgica
Candidiasis mucocutánea crónica	Afecciones de intoxicación yatrogénica	Neumonía por Pneumocistis carinii	Enfermedades Venosas
Enfermedad pulmonar obstructiva crónica	Enfermedad de Addison Idiopática	Neumonía	Trombosis Venosa
Enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD)	Leucopenia Idiopática	Deficiencia Poliglandular tipo I y deficiencia poliglandular tipo II	Fibrilación Ventricular
intoxicación crónica con salicilato	Fibrosis pulmonar Idiopática	neuralgia Post herpética	Infecciones Víricas y fúngicas
Dolor visceral crónico	trombocitopenia Idiopática	Síndrome Post perfusión	Visceralgia o síndrome de colon irritable
Migraña en racimo	Enfermedad hepática Idiosincrásica	Síndrome Post bomba	Encefalitis Vital / meningitis aséptica
Colitis	Dolor Post-quirúrgico	Síndrome Post-Miocardiotomía	Síndrome Vital asociado hemofagocítico
Enfermedades vasculares de colágeno	Atrofia muscular espinal Infantil	Enfermedad pulmonar intersticial Post-inflamatoria	Vitiligo
Carcinoma Colorrectal	Enfermedades Infecciosas	Enfermedad pulmonar intersticial Post-infecciosa	Enfermedad hepática Vitiligo aguda
Inmunodeficiencia común variada (hipogammaglobulinemia común variable)	Inflamación de la aorta	Pre-eclampsia	Degeneración Walleriana
Enfermedades Congénitas	Enfermedad intestinal Inflamatoria	Fallo ovárico prematuro	Granulomatosis de Wegener

Fallo cardiaco Congestivo	Trastornos intestinales inflamatorios	Cirrosis biliar Primaria	Síndrome de Wertucke-Korsakoff
Conjuntivitis	Enfermedades inflamatorias	Mixedema Primario	Enfermedad de Wilson
Enfermedad pulmonar intersticial asociada a enfermedades del tejido conjuntivo	Trastornos inflamatorios del ojo	Hipertensión pulmonar Primario	Heridas
Dermatitis de Contacto	Trastornos inflamatorios o de vejiga inestable	Colangitis esclerosante Primaria	Rechazo de xenoinjertos de cualquier órgano o tejido
Anemia hemolítica Coombs positiva	Dolor inflamatorio	Hepatitis esclerosante Primaria	Artropatía asociada a yersinia y salmonela
Cor pulmonale	Dolor inflamatorio e hiperalgesia y alodinia asociadas	Vasculitis Primaria	
Enfermedad arterial coronaria	Influenza A	Parálisis supranuclear progresiva	
Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob	Diabetes mellitus dependiente de insulina		

LISTADO DE SECUENCIAS

- 5 <110> SomaLogic, Inc.
- <120> Aptámeros contra β -NGF y su uso en el tratamiento de enfermedades y trastornos mediados por β -NGF
- <130> 0057.25/PCT
- 10 <150> 61/323.145
<151> 12-04-2010
- <160> 169
- 15 <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
<211> 76
<212> ADN
- 20 <213> Secuencia Artificial
- <220>
<223> Sintético
- 25 <220>
<221> misc_feature
<222> (30)..(30)
<223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
- 30 <220>
<221> misc_feature
<222> (37)..(38)
<223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
- 35 <220>
<221> misc_feature
<222> (43)..(45)

ES 2 610 159 T3

<223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

<220>
 <221> misc_feature
 5 <222> (51)..(52)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

<220>
 <221> misc_feature
 10 <222> (54)..(54)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

<400> 1

gagtgaccgt ctgcctgcag cgggacacan gaggacnngg ggnnnagccg nngnggcaca 60

gagaagaaac aagacc 76

15

<210> 2
 <211> 28
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintético

25

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(3)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

30

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (10)..(11)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

35

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (16)..(18)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

40

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (24) .. (25)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

45

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (27) .. (27)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

50 <400> 2

cangaggacn nggggnnag ccgnngng 28

<210> 3
 <211> 28
 55 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintético

60

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)

ES 2 610 159 T3

<223> una G, T, U, o C

<220>
<221> misc_feature
5 <222> (3)..(3)
<223> Seleccionado independientemente entre un nucleótido modificado, específicamente una pirimidina modificada

<220>
10 <221> misc_feature
<222> (5)..(5)
<223> una A o G

<220>
15 <221> misc_feature
<222> (8)..(8)
<223> una A o G

<220>
20 <221> misc_feature
<222> (9) .. (9)
<223> una C o G

<220>
25 <221> misc_feature
<222> (10)..(11)
<223> Seleccionado independientemente entre un nucleótido modificado, específicamente una pirimidina modificada

<220>
30 <221> misc_feature
<222> (16)..(18)
<223> Seleccionado independientemente entre un nucleótido modificado, específicamente una pirimidina modificada

<220>
35 <221> misc_feature
<222> (20)..(20)
<223> una A, G, T, o U

<220>
40 <221> misc_feature
<222> (24) .. (25)
<223> Seleccionado independientemente entre un nucleótido modificado, específicamente una pirimidina modificada

<220>
45 <221> misc_feature
<222> (26)..(26)
<223> una A o G

<220>
50 <221> misc_feature
<222> (27) .. (27)
<223> Seleccionado independientemente entre un nucleótido modificado, específicamente una pirimidina modificada

<400> 3
nangnggnnn nggggnnnan ccgnnnng 28

60 <210> 4
<211> 50
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

65

<220>
 <223> Sintético

5 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (30)..(30)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

10 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (37)..(38)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (43)..(45)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

20 <400> 4
 gagtgaccgt ctgcctgcag cgggacacan gaggacnngg ggnnnagccg 50

25 <210> 5
 <211> 50
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> Sintético

30 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (29) .. (29)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

35 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (36)..(36)
 <223> n e s a , c , g , o t

40 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (37)..(38)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

45 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (42)..(44)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

50 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (50)..(50)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

55 <400> 5
 agtgaccgtc tgccctgcagc gggacacang aggacnngg gnnnagccgn 50

60 <210> 6
 <211> 50
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

65 <220>
 <223> Sintético

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (28) .. (28)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 5

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (35)..(36)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 10

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (41)..(43)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 15

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (49)..(50)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 20

<400> 6
 gtgaccgtct gcctgcagcg ggacacanga ggacnngggg nnnagccggn 50

<210> 7
 <211> 50
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 25

<220>
 <223> Sintético
 30

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (27) .. (27)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 35

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (34)..(35)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 40

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (40)..(42)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 45

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (48)..(49)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 50

<400> 7
 tgaccgtctg cctgcagcgg gacacangag gacnnggggn nnagccgngn 50

<210> 8
 <211> 50
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 55

<220>
 <223> Sintético
 60

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (26)..(26)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 65

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (33)..(34)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 5

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (39)..(41)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 10

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (47)..(48)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 15

<400> 8
 gaccgtctgc ctgcagcggg acacangagg acnnggggnn nagccgnngt 50

<210> 9
 <211> 50
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 20

<220>
 <223> Sintético
 25

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (25) .. (25)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 30

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (32)..(33)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 35

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (38)..(40)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 40

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (46)..(47)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 45

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (49) .. (49)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 50

<400> 9
 accgtctgcc tgcagcggga cacangagga cnnggggnnn agccgnngng 50

<210> 10
 <211> 50
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 55

<220>
 <223> Sintético
 60

<220>
 <221> misc_feature

ES 2 610 159 T3

<222> (24) .. (24)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

 <220>
 5 <221> misc_feature
 <222> (31)..(32)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

 <220>
 10 <221> misc_feature
 <222> (37)..(39)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

 <220>
 15 <221> misc_feature
 <222> (45)..(46)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

 <220>
 20 <221> misc_feature
 <222> (48)..(48)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

 <400> 10
 25 ccgtctgcct gcagcgggac acangaggac nnggggnna gccgnngngg 50

 <210> 11
 <211> 52
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintético

 <220>
 35 <221> misc_feature
 <222> (23) .. (24)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

 <220>
 40 <221> misc_feature
 <222> (31)..(33)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

 <220>
 45 <221> misc_feature
 <222> (38)..(40)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

 <220>
 50 <221> misc_feature
 <222> (46)..(47)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

 <220>
 55 <221> misc_feature
 <222> (49) .. (49)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

 <400> 11
 60 cgtctgcctg cagcgggaca canngaggac nnggggnnn agccgnngng gc 52

 <210> 12
 <211> 50
 65 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintético

5

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (22)..(22)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

10

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (29) .. (30)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

15

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (35)..(37)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

20

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (43)..(44)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

25

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (46)..(46)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

30

<400> 12
 gtctgcctgc agcgggacac angaggacnn ggggnnnagc cgnngnggca 50

<210> 13
 <211> 50

35

<212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintético

40

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (21) .. (21)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

45

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (28) .. (29)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

50

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (34)..(36)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

55

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (42)..(42)
 <223> n es a, c, g, o t

60

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (43)..(44)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

65

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (45)..(45)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 5
 <400> 13
 tctgcctgca gggggacaca ngaggacnng gggnnnagcc gnnngggcac 50
 10
 <210> 14
 <211> 50
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 15
 <220>
 <223> Sintético
 20
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (20)..(20)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 25
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (27) .. (28)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 30
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (33)..(35)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 35
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (41)..(41)
 <223> n es a, c, g, o t
 40
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (42)..(43)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 45
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (44)..(44)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <400> 14
 ctgcctgcag cgggacacan gaggacnng ggnnagccg nngnggcaca 50
 50
 <210> 15
 <211> 50
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 55
 <220>
 <223> Sintético
 60
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (19) .. (19)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 65
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (26)..(27)

<223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (32)..(34)
 5 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (40)..(41)
 10 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (43)..(43)
 15 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

 <400> 15
 tgctgcagc gggacacang aggacnnggg gnnnagccgn ngnggcacag 50

 20 <210> 16
 <211> 50
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 25 <220>
 <223> Sintético

 <220>
 <221> misc_feature
 30 <222> (18)..(18)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

 <220>
 <221> misc_feature
 35 <222> (25) .. (26)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

 <220>
 <221> misc_feature
 40 <222> (31)..(33)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

 <220>
 <221> misc_feature
 45 <222> (39)..(40)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

 <220>
 <221> misc_feature
 50 <222> (42)..(42)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

 <400> 16
 gcctgcagcg ggacacanga ggacnnggg nnnagccgn ngngcacaga 50

 55 <210> 17
 <211> 50
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 60 <220>
 <223> Sintético

 <220>

<221> misc_feature
 <222> (17)..(17)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

5

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (24) .. (25)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

10

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (30)..(32)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

15

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (38)..(39)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

20

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (41)..(41)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

25

<400> 17
 cctgcagcgg gacacangag gacnnggggn nnagccgngg nggcacagag 50

<210> 18
 <211> 50

30

<212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintético

35

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (16)..(16)
 <223> n es a, c, g, o t

40

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (18)..(18)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

45

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (23) .. (24)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

50

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (29) .. (31)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

55

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (37)..(38)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

60

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (40)..(40)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

65

ES 2 610 159 T3

<400> 18
ctgcagcggg acacangagg acnngggggn nagccgngn ggcacagaga 50

5 <210> 19
<211> 50
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

10 <220>
<223> Sintético

15 <220>
<221> misc_feature
<222> (15)..(15)
<223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

20 <220>
<221> misc_feature
<222> (22)..(23)
<223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

25 <220>
<221> misc_feature
<222> (28)..(30)
<223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

30 <220>
<221> misc_feature
<222> (36)..(37)
<223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

35 <220>
<221> misc_feature
<222> (39) .. (39)
<223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

<400> 19
tgcagcggga cacangagga cnnggggnn agccgngng gcacagagaa 50

40 <210> 20
<211> 50
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

45 <220>
<223> Sintético

50 <220>
<221> misc_feature
<222> (14)..(14)
<223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

55 <220>
<221> misc_feature
<222> (21) .. (22)
<223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

60 <220>
<221> misc_feature
<222> (27) .. (29)
<223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

65 <220>
<221> misc_feature
<222> (35)..(36)

ES 2 610 159 T3

<223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (38)..(38)
 5 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

 <400> 20
 gcagcgggac acangaggac nnggggnna gccgnngngg cacagagaag 50

 10 <210> 21
 <211> 50
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 15 <220>
 <223> Sintético

 <220>
 <221> misc_feature
 20 <222> (13)..(13)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

 <220>
 <221> misc_feature
 25 <222> (20) .. (21)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

 <220>
 <221> misc_feature
 30 <222> (26)..(28)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

 <220>
 <221> misc_feature
 35 <222> (34)..(35)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

 <220>
 <221> misc_feature
 40 <222> (37)..(37)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

 <400> 21
 cagcgggaca cangaggach nnggggnnag ccgnngnggc acagagaaga 50
 45
 <210> 22
 <211> 50
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 50
 <220>
 <223> Sintético

 <220>
 <221> misc_feature
 55 <222> (12)..(12)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

 <220>
 <221> misc_feature
 60 <222> (19) .. (20)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

 <220>
 <221> misc_feature
 65

<222> (25) .. (27)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

5 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (33)..(34)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

10 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (36)..(36)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

15 <400> 22
 agcgggacac angaggacnn ggggnnnagc cgngngggca cagagaagaa 50

20 <210> 23
 <211> 50
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (11)..(11)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

30 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (18)..(19)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

35 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (24) .. (26)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

40 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (32)..(33)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

45 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (34)..(34)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

50 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (35)..(35)
 <223> n es a, c, g, o t

55 <400> 23
 gcgggacaca ngaggacnng ggggnnnagcc gnngngggcac agagaagaaa 50

60 <210> 24
 <211> 50
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintético

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 5 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoksiuridina

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (17)..(18)
 10 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoksiuridina

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (23) .. (25)
 15 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoksiuridina

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (31)..(32)
 20 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoksiuridina

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (34)..(34)
 25 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoksiuridina

<400> 24
 cgggacacan gaggacnngg ggnnnagccg nngnggcaca gagaagaaac 50

30 <210> 25
 <211> 50
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> Sintético

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (9) .. (9)
 40 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoksiuridina

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (16)..(17)
 45 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoksiuridina

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (22)..(24)
 50 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoksiuridina

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (30)..(31)
 55 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoksiuridina

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (33)..(33)
 60 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoksiuridina

<400> 25
 gggacacang aggacnnggg gnnnagccgn ngnggcacag agaagaaaca 50

65

<210> 26
 <211> 50
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> Sintético
 <220>
 10 <221> misc_feature
 <222> (8)..(8)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <220>
 15 <221> misc_feature
 <222> (15)..(16)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <220>
 20 <221> misc_feature
 <222> (21) .. (26)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <220>
 25 <221> misc_feature
 <222> (29) .. (30)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <220>
 30 <221> misc_feature
 <222> (32)..(32)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <400> 26
 35 ggacacanga ggacnngggg nnnagccggn gnggcacaga gaagaacaa 50
 <210> 27
 <211> 50
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 40
 <220>
 <223> Sintético
 <220>
 45 <221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <220>
 50 <221> misc_feature
 <222> (14)..(15)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <220>
 55 <221> misc_feature
 <222> (20)..(22)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <220>
 60 <221> misc_feature
 <222> (28) .. (29)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <220>
 65

<221> misc_feature
 <222> (31)..(31)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 5 <400> 27
 gacacangag gacnnggggn nnagccgngg nggcacagag aagaacaag 50

 <210> 28
 <211> 50
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintético
 15
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (6)..(6)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 20
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (13)..(14)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 25
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (19) .. (21)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 30
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (27) .. (28)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 35
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (30)..(30)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 40
 <400> 28
 acacangagg acnnggggnn nagccgngn ggacagaga agaaacaaga 50

 <210> 29
 <211> 50
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintético
 50
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (5)..(5)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 55
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (12)..(13)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 60
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (18)..(20)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 65

ES 2 610 159 T3

5 <220>
<221> misc_feature
<222> (26)..(27)
<223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

10 <220>
<221> misc_feature
<222> (29) .. (29)
<223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

15 <400> 29
cacangagga cngggggnnn agccgnngng gcacagagaa gaaacaagac 50

20 <210> 30
<211> 50
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

25 <220>
<223> Sintético

30 <220>
<221> misc_feature
<222> (4)..(4)
<223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

35 <220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(12)
<223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

40 <220>
<221> misc_feature
<222> (17)..(19)
<223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

45 <220>
<221> misc_feature
<222> (25) .. (26)
<223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

50 <220>
<221> misc_feature
<222> (28) .. (28)
<223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

55 <400> 30
acangaggac nnggggnna gccgnngngg cacagagaag aaacaagacc 50

60 <210> 31
<211> 40
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

65 <220>
<223> Sintético

70 <220>
<221> misc_feature
<222> (15)..(15)
<223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

75 <220>
<221> misc_feature

- <222> (22)..(23)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
- 5 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (28)..(30)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
- 10 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (36)..(37)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
- 15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (39) .. (39)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
- 20 <400> 31
 tgcagcggga cacangagga cnnggggnnn agccgnngng 40
- 25 <210> 32
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
- 30 <220>
 <223> Sintético
- 35 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (14)..(14)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
- 40 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (21) .. (22)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
- 45 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (27) .. (29)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
- 50 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (35)..(36)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
- 55 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (38)..(38)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
- 60 <400> 32
 gcagcgggac acangaggac nnggggnna gccgnngng 39
- 65 <210> 33
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
- <220>
 <223> Sintético

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (13)..(13)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 5

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (20)..(21)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 10

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (26)..(28)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 15

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (34)..(35)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 20

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (37)..(37)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 25

<400> 33
 cagcgggaca cangaggacn nggggnnag ccgnngng 38

<210> 34
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 30

<220>
 <223> Sintético
 35

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (12)..(12)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 40

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (19)..(20)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 45

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (25)..(27)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 50

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (33)..(34)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 55

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (36)..(36)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 60

<400> 34
 agcgggacac angaggacnn ggggnnagc cgngngng 37

<210> 35
 65

<211> 36
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> Sintético

<220>
 <221> misc_feature
 10 <222> (11)..(11)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

<220>
 <221> misc_feature
 15 <222> (18)..(19)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

<220>
 <221> misc_feature
 20 <222> (24) .. (26)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

<220>
 <221> misc_feature
 25 <222> (32)..(33)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

<220>
 <221> misc_feature
 30 <222> (35)..(35)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

<400> 35
 gcgggacaca ngaggacnng gggnnnagcc gnnng 36

35

<210> 36
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

40

<220>
 <223> Sintético

<220>
 <221> misc_feature
 45 <222> (10)..(10)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

<220>
 <221> misc_feature
 50 <222> (17)..(18)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

<220>
 <221> misc_feature
 55 <222> (23) .. (25)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

<220>
 <221> misc_feature
 60 <222> (31)..(32)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

<220>
 <221> misc_feature
 65

<222> (34)..(34)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <400> 36
 cgggacacan gaggacnngg ggnnnagccg nngng 35
 5
 <210> 37
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 10
 <220>
 <223> Sintético
 <220>
 15
 <221> misc_feature
 <222> (9) .. (9)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <220>
 20
 <221> misc_feature
 <222> (16)..(17)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <220>
 25
 <221> misc_feature
 <222> (22)..(24)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <220>
 30
 <221> misc_feature
 <222> (30)..(31)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <220>
 35
 <221> misc_feature
 <222> (33)..(33)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <400> 37
 40
 gggacacang aggacnnggg gnnnagccgn ngng 34
 <210> 38
 <211> 33
 <212> ADN
 45
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintético
 50
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (8)..(8)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 55
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (15)..(16)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 60
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (21) .. (23)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 65
 <220>

<221> misc_feature
 <222> (29) .. (30)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

5

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (32)..(32)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

10

<400> 38
 ggacacanga ggacnngggg nnnagccggn gng 33

<210> 39
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

15

<220>
 <223> Sintético

20

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

25

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (14)..(15)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

30

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (20)..(22)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

35

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (28) .. (29)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

40

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (31)..(31)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

45

<400> 39
 gacacangag gacnnggggn nnagccgng ng 32

<210> 40
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

50

<220>
 <223> Sintético

55

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (6)..(6)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

60

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (13)..(14)

<223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoksiuridina

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (19) .. (21)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 5

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (27) .. (28)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 10

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (30)..(30)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 15

<400> 40
 acacangagg acnnggggnn nagccgnngn g 31
 20

<210> 41
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 25

<220>
 <223> Sintético
 30

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (5)..(5)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 35

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (12)..(13)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 40

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (18)..(20)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 45

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (26)..(27)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 50

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (29) .. (29)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 55

<400> 41
 cacangagga cnnggggnn agccgnngng 30
 60

<210> 42
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 65

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (4)..(4)

<223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <220>
 <221> misc_feature
 5 <222> (11)..(12)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <220>
 <221> misc_feature
 10 <222> (17)..(19)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <220>
 <221> misc_feature
 15 <222> (25) .. (26)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <220>
 <221> misc_feature
 20 <222> (28) .. (28)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <400> 42
 acangaggac nnggggnna gccgnngng 29
 25
 <210> 43
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 30
 <220>
 <223> Sintético
 <220>
 <221> misc_feature
 35 <222> (2)..(2)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <220>
 <221> misc_feature
 40 <222> (9)..(10)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <220>
 <221> misc_feature
 45 <222> (15)..(17)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <220>
 <221> misc_feature
 50 <222> (23) .. (24)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <220>
 <221> misc_feature
 55 <222> (26)..(26)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <400> 43
 angaggacnn ggggnnagc cgngng 27
 60
 <210> 44
 <211> 26
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia Artificial

- <220>
<223> Sintético
- 5 <220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
- 10 <220>
<221> misc_feature
<222> (8)..(9)
<223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
- 15 <220>
<221> misc_feature
<222> (14)..(16)
<223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
- 20 <220>
<221> misc_feature
<222> (22)..(23)
<223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
- 25 <220>
<221> misc_feature
<222> (25) .. (25)
<223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
- 30 <400> 44
ngaggacnng gggnnnagcc gnnng 26
- 35 <210> 45
<211> 28
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
- <220>
<223> Sintético
- 40 <220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> una G, T, U, o C
- 45 <220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(3)
<223> Seleccionado independientemente entre un nucleótido modificado, específicamente una pirimidina modificada
- 50 <220>
<221> misc_feature
<222> (5)..(5)
<223> una A o G
- 55 <220>
<221> misc_feature
<222> (8)..(8)
<223> una A o G
- 60 <220>
<221> misc_feature
<222> (9) .. (9)
<223> una C o G
- 65

ES 2 610 159 T3

- 5 <220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(10)
<223> Seleccionado independientemente entre un nucleótido modificado, específicamente una pirimidina modificada
- 10 <220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(11)
<223> Seleccionado independientemente entre un nucleótido modificado, específicamente una pirimidina modificada, o T
- 15 <220>
<221> misc_feature
<222> (16)..(17)
<223> Seleccionado independientemente entre un nucleótido modificado, específicamente una pirimidina modificada
- 20 <220>
<221> misc_feature
<222> (18)..(18)
<223> Seleccionado independientemente entre un nucleótido modificado, específicamente una pirimidina modificada, o T
- 25 <220>
<221> misc_feature
<222> (20)..(20)
<223> una A, G, T o U
- 30 <220>
<221> misc_feature
<222> (24) .. (25)
<223> Seleccionado independientemente entre un nucleótido modificado, específicamente una pirimidina modificada
- 35 <220>
<221> misc_feature
<222> (26)..(26)
<223> una A o G
- 40 <220>
<221> misc_feature
<222> (27) .. (27)
<223> Seleccionado independientemente entre un nucleótido modificado, específicamente una pirimidina modificada
- 45 <400> 45
nangnggnnn nggggnnan ccgnnng 28
- 50 <210> 46
<211> 85
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
- 55 <220>
<223> Sintético
- 60 <220>
<221> misc_feature
<222> (29) .. (68)
<223> n es a, c, g, o t
- <400> 46

	ttttttttgg tcttgtttct tctctgtggn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn	60
	nnnnnnnnca ggcagacggt cactc	85
5	<210> 47 <211> 25 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
10	<220> <223> Sintético <400> 47 atatatatga gtgaccgtct gcctg 25	
15	<210> 48 <211> 28 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
20	<220> <223> Sintético <400> 48 ttttttgg tcttgtttct tctctgtg 28	
25	<210> 49 <211> 39 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
30	<220> <223> Sintético	
35	<220> <221> misc_feature <222> (13)..(13) <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina	
40	<220> <221> misc_feature <222> (20)..(21) <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina	
45	<220> <221> misc_feature <222> (26)..(28) <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina	
50	<220> <221> misc_feature <222> (34)..(35) <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina	
55	<220> <221> misc_feature <222> (37)..(37) <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina	
60	<400> 49 cagcgggaca cangaggach nggggnngg ccgnngngg 39 <210> 50	

<211> 39
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> Sintético

<220>
 <221> misc_feature
 10 <222> (13)..(13)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

<220>
 <221> misc_feature
 15 <222> (20)..(21)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

<220>
 <221> misc_feature
 20 <222> (26)..(28)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

<220>
 <221> misc_feature
 25 <222> (34)..(35)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

<220>
 <221> misc_feature
 30 <222> (37)..(37)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

<400> 50
 cagcgggaca cangaggach nggggnnag ccgnngnc 39

35

<210> 51
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

40

<220>
 <223> Sintético

<220>
 <221> misc_feature
 45 <222> (14)..(14)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

<220>
 <221> misc_feature
 50 <222> (22)..(22)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

<220>
 <221> misc_feature
 55 <222> (27) .. (29)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

<220>
 <221> misc_feature
 60 <222> (35)..(36)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

<220>
 <221> misc_feature
 65

<222> (38)..(38)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

 <400> 51
 5 gcagcgggac acangaggac angggnnna gccgnngngg 40

 <210> 52
 <211> 40
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintético

 15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (14)..(14)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

 20 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (22)..(22)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

 25 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (27) .. (29)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

 30 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (35)..(36)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

 35 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (38)..(38)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

 40 <400> 52
 gcagcgggac acangaggac cnggggnnna gccgnngngg 40

 <210> 53
 <211> 40
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintético

 50 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (14)..(14)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

 55 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (21) .. (22)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

 60 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (27) .. (29)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

 65

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (35)..(36)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 5

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (38)..(38)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 10

<400> 53
 gcggcgggac acangaggac nnggggnna gccgnngngg 40

<210> 54
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 15

<220>
 <223> Sintético
 20

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (14)..(15)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 25

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (21) .. (22)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 30

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (27) .. (29)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 35

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (35)..(36)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 40

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (38)..(38)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 45

<400> 54
 gcagcgggac acannaggac nnggggnna gccgnngngg 40

<210> 55
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 50

<220>
 <223> Sintético
 55

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (14)..(14)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 60

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (21) .. (22)
 65

<223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <220>
 <221> misc_feature
 5 <222> (27) .. (29)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <220>
 <221> misc_feature
 10 <222> (35)..(36)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <220>
 <221> misc_feature
 15 <222> (38)..(38)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <400> 55
 gcagcggaac acangaggac nnggggnna gccgnngngg 40
 20
 <210> 56
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 25
 <220>
 <223> Sintético
 <220>
 30 <221> misc_feature
 <222> (8)..(8)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <220>
 35 <221> misc_feature
 <222> (14)..(14)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <220>
 40 <221> misc_feature
 <222> (21) .. (22)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <220>
 45 <221> misc_feature
 <222> (27) .. (29)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <220>
 50 <221> misc_feature
 <222> (35)..(36)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <220>
 55 <221> misc_feature
 <222> (38)..(38)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <400> 56
 60 gcagcggnac acangaggac nnggggnna gccgnngngg 40
 <210> 57
 <211> 40
 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintético
 5
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (13)..(13)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 10
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (20)..(21)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 15
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (25) .. (27)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 20
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (33)..(34)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 25
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (36)..(36)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 30
 <400> 57
 cagcgggaca cangaggach ngggnnnagc cgnngnggca 40
 35
 <210> 58
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 40
 <220>
 <223> Sintético
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 45
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (14)..(14)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 50
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (21) .. (22)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 55
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (27) .. (29)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 60
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (35)..(36)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 65

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (38)..(36)
 5 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (38)..(38)
 10 <223> n e s a , c , g , o t

<400> 58
 ncagcgggac acangaggac nnggggnna gccgnngngg 40

15 <210> 59
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Sintético

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (14)..(14)
 25 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (21) .. (22)
 30 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (27) .. (29)
 35 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (35)..(36)
 40 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (38)..(38)
 45 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

<400> 59
 gcagcgggac acangaggac nnggggnna gccgnngngg 40

50 <210> 60
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

55 <220>
 <223> Sintético

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (14)..(14)
 60 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

<220>
 <221> misc_feature
 65

<222> (21) .. (22)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

 <220>
 5 <221> misc_feature
 <222> (27) .. (29)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

 <220>
 10 <221> misc_feature
 <222> (32)..(32)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

 <220>
 15 <221> misc_feature
 <222> (35)..(36)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

 <220>
 20 <221> misc_feature
 <222> (38)..(38)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

 <400> 60
 25 gcagcgggac acangaggac nnggggnna gncgnnggg 40

 <210> 61
 <211> 40
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintético

 <220>
 35 <221> misc_feature
 <222> (14)..(14)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

 <220>
 40 <221> misc_feature
 <222> (21) .. (22)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

 <220>
 45 <221> misc_feature
 <222> (27) .. (29)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

 <220>
 50 <221> misc_feature
 <222> (35)..(36)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

 <220>
 55 <221> misc_feature
 <222> (38)..(38)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

 <400> 61
 60 gcagcgggac acangaggac nnggggnna gccannggg 40

 <210> 62
 <211> 40
 65 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintético
 5
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (14)..(14)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 10
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (21) .. (22)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 15
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (27) .. (29)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 20
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (34)..(36)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 25
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (38)..(38)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 30
 <400> 62
 gcagcgggac acangaggac nnggggnna gccnngngg 40
 35
 <210> 63
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 40
 <220>
 <223> Sintético
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 45
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (12)..(12)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 50
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (14)..(14)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 55
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (21) .. (22)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 60
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (27) .. (29)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 65

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (35)..(36)
 5 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (38)..(38)
 10 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

<400> 63
 gcagcngac anangaggac nnggggnna gccgnngngg 40

15 <210> 64
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Sintético

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (14)..(14)
 25 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(22)
 30 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (27)..(29)
 35 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (35)..(36)
 40 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (38)..(38)
 45 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

<400> 64
 gcagcgggac acangaggac nnggggnna gccgnngnag 40

50 <210> 65
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

55 <220>
 <223> Sintético

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 60 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

<220>
 <221> misc_feature
 65

<222> (14)..(14)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

 <220>
 5 <221> misc_feature
 <222> (21) .. (22)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

 <220>
 10 <221> misc_feature
 <222> (27) .. (29)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

 <220>
 15 <221> misc_feature
 <222> (35)..(36)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

 <220>
 20 <221> misc_feature
 <222> (38)..(38)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

 <400> 65
 25 gnagcgggac acangaggac nnggggnna accgnnggg 40

 <210> 66
 <211> 40
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintético

 <220>
 35 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

 <220>
 40 <221> misc_feature
 <222> (14)..(14)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

 <220>
 45 <221> misc_feature
 <222> (21) .. (22)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

 <220>
 50 <221> misc_feature
 <222> (27) .. (29)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

 <220>
 55 <221> misc_feature
 <222> (35)..(36)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

 <220>
 60 <221> misc_feature
 <222> (38)..(38)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

 <400> 66
 65

gnagcgggac acanggggac nnggggnna accgnngngg 40

5 <210> 67
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Sintético

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (14)..(14)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(22)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

20 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (27)..(29)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

25 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (35)..(36)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

30 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (38)..(38)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

35 <400> 67
 gaagcgggac acangaggac nnggggnna accgnngngg 40

40 <210> 68
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> Sintético

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (14)..(14)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

50 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(22)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

55 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (27)..(29)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

60 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (35)..(36)

<223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <220>
 <221> misc_feature
 5 <222> (38)..(38)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <400> 68
 gcagcgggac acangaggac nngaggnna accgnngngg 40
 10
 <210> 69
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 15
 <220>
 <223> Sintético
 <220>
 20 <221> misc_feature
 <222> (14)..(14)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <220>
 25 <221> misc_feature
 <222> (21)..(22)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <220>
 30 <221> misc_feature
 <222> (27)..(29)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <220>
 35 <221> misc_feature
 <222> (35)..(36)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <220>
 40 <221> misc_feature
 <222> (38)..(38)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <400> 69
 45 gcagcgggac acangaggac nnggggnna accgnngngg 40
 <210> 70
 <211> 40
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintético
 <220>
 55 <221> misc_feature
 <222> (14)..(14)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <220>
 60 <221> misc_feature
 <222> (18)..(18)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <220>
 65

<221> misc_feature
 <222> (21)..(22)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

5

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (27)..(28)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

10

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (34)..(35)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

15

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (37)..(37)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

20

<400> 70
 gcagcgggac acangagnac nnggggnaa ccgnngnggc 40

25

<210> 71
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

30

<220>
 <223> Sintético

35

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (14)..(14)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

40

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(22)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

45

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (27)..(28)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

50

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (34)..(35)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

55

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (37)..(37)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

60

<400> 71
 gcagcgggac acangaggac nnggggnaa ccgnngnggc 40

65

<210> 72
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintético

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (14)..(14)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 5

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(22)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 10

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (27)..(29)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 15

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (35)..(36)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 20

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (38)..(38)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 25

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (40)..(40)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 30

<400> 72
 gcagcgggac acangaggac nnggggnna accgnngngn 40

<210> 73
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35

<220>
 <223> Sintético
 40

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (14)..(14)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 45

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(22)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 50

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (27)..(29)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 55

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (35)..(36)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 60

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (38)..(39)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 65

ES 2 610 159 T3

<400> 73
gaagcgggac acangaggac nnggggnna gccgnngng 40

5 <210> 74
<211> 40
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

10 <220>
<223> Sintético

15 <220>
<221> misc_feature
<222> (14)..(14)
<223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

20 <220>
<221> misc_feature
<222> (21)..(22)
<223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

25 <220>
<221> misc_feature
<222> (27)..(29)
<223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

30 <220>
<221> misc_feature
<222> (35)..(36)
<223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

35 <220>
<221> misc_feature
<222> (38)..(38)
<223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

<400> 74
gaagcgggac acangaggac nnggggnna gccgnngngg 40

40 <210> 75
<211> 40
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

45 <220>
<223> Sintético

50 <220>
<221> misc_feature
<222> (14)..(14)
<223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

55 <220>
<221> misc_feature
<222> (17)..(17)
<223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

60 <220>
<221> misc_feature
<222> (21)..(22)
<223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

65 <220>
<221> misc_feature
<222> (27)..(29)

<223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <220>
 <221> misc_feature
 5 <222> (35)..(36)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <220>
 <221> misc_feature
 10 <222> (38)..(38)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <400> 75
 gcaacgggac acangangac nnggggnna gccgnngngg 40
 15 <210> 76
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 20 <220>
 <223> Sintético
 <220>
 25 <221> misc_feature
 <222> (14)..(14)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <220>
 30 <221> misc_feature
 <222> (17)..(17)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <220>
 35 <221> misc_feature
 <222> (21)..(23)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <220>
 40 <221> misc_feature
 <222> (27)..(29)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <220>
 45 <221> misc_feature
 <222> (35)..(36)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <220>
 50 <221> misc_feature
 <222> (38)..(38)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <400> 76
 55 gcagcgggac acangangac nnggggnna gccgnnangg 40
 <210> 77
 <211> 40
 <212> ADN
 60 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintético
 65 <220>

<221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

5

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (14)..(14)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

10

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (17)..(17)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

15

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(22)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

20

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (27)..(29)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

25

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (35)..(36)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

30

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (38)..(38)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

35

<400> 77
 gnagcgggac acangangac nnggggnna gccgnngngg 40

40

<210> 78
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

45

<220>
 <223> Sintético

50

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

55

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (14)..(14)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

60

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(22)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

65

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (28)..(29)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (35)..(36)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 5
 <400> 78
 gnagcgggac acangaggac nngggggna gccgnngcgg 40

 <210> 79
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 10

 <220>
 <223> Sintético
 15

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 20

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (14)..(14)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 25

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(22)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 30

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (27)..(29)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 35

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (35)..(36)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 40

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (38)..(38)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 45

 <400> 79
 gnagcgggac acangaggac nnggggnna gccgnngngg 40
 50
 <210> 80
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintético
 55

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (14)..(14)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 60

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(22)
 65

<223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <220>
 <221> misc_feature
 5 <222> (27)..(29)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <220>
 <221> misc_feature
 10 <222> (35)..(36)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <220>
 <221> misc_feature
 15 <222> (38)..(38)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <400> 80
 20 gcagcggggc acangaggac nnggggnna gccgnngngg 40
 <210> 81
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 25 <220>
 <223> Sintético
 <220>
 30 <221> misc_feature
 <222> (14)..(14)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <220>
 35 <221> misc_feature
 <222> (21)..(22)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <220>
 40 <221> misc_feature
 <222> (27)..(29)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <220>
 45 <221> misc_feature
 <222> (35)..(36)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <220>
 50 <221> misc_feature
 <222> (38)..(38)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <400> 81
 55 gcagcgggac acangaggac nnggggnna gcagnnangg 40
 <210> 82
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> Sintético
 65 <220>

<221> misc_feature
 <222> (5)..(5)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

5

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (14)..(14)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

10

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(22)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

15

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (27)..(29)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

20

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (35)..(36)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

25

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (38)..(38)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

30

<400> 82
 gcagngggac acangaggac nnggggnna gccgnnangc 40

<210> 83
 <211> 40

35

<212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintético

40

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (14)..(14)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

45

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(22)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

50

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (27)..(29)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

55

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (35)..(36)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

60

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (38)..(38)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

65

ES 2 610 159 T3

<400> 83
gcagcgggac acangaggac nnggggnna gccgnnangc 40

5 <210> 84
<211> 40
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

10 <220>
<223> Sintético

15 <220>
<221> misc_feature
<222> (14)..(14)
<223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

20 <220>
<221> misc_feature
<222> (21)..(22)
<223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

25 <220>
<221> misc_feature
<222> (27)..(29)
<223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

30 <220>
<221> misc_feature
<222> (35)..(36)
<223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

35 <220>
<221> misc_feature
<222> (38)..(38)
<223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

<400> 84
gcagcgggac acangaggac nnggggnna gccgnngngc 40

40 <210> 85
<211> 40
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

45 <220>
<223> Sintético

50 <220>
<221> misc_feature
<222> (14)..(14)
<223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

55 <220>
<221> misc_feature
<222> (21)..(22)
<223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

60 <220>
<221> misc_feature
<222> (27)..(29)
<223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

65 <220>
<221> misc_feature
<222> (35)..(36)

<223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <220>
 <221> misc_feature
 5 <222> (38)..(38)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <400> 85
 gcagcgggac acangaggac nnggggnna gccgnngnga 40
 10
 <210> 86
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 15
 <220>
 <223> Sintético
 <220>
 20 <221> misc_feature
 <222> (14)..(14)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <220>
 25 <221> misc_feature
 <222> (18)..(18)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <220>
 30 <221> misc_feature
 <222> (21)..(22)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <220>
 35 <221> misc_feature
 <222> (27)..(29)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <220>
 40 <221> misc_feature
 <222> (35)..(36)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <220>
 45 <221> misc_feature
 <222> (38)..(38)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <400> 86
 50 gcagccggac acangagnac nnggggnna gccgnngngg 40
 <210> 87
 <211> 40
 <212> ADN
 55 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintético
 <220>
 60 <221> misc_feature
 <222> (6)..(6)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 65 <220>

<221> misc_feature
 <222> (21)..(22)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 5 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (27)..(29)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 10 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (33)..(33)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (35)..(36)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 20 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (38)..(38)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 25 <400> 87
 gcagcnggac acacgaggac nnggggnna gcngnnggg 40
 <210> 88
 <211> 40
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintético
 35 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (14)..(14)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 40 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(22)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 45 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (27)..(29)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 50 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (35)..(36)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 55 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (38)..(38)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 60 <400> 88
 gcagcaggac acangaggac nnggggnna gccngnnggg 40
 <210> 89
 65 <211> 40

<212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 5 <223> Sintético

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (5)..(5)
 10 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (14)..(14)
 15 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(22)
 20 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (27)..(29)
 25 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (35)..(36)
 30 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (38)..(38)
 35 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

 <400> 89
 gcagnaggac acangaggac nnggggnna gccgnngngg 40

 40 <210> 90
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 45 <220>
 <223> Sintético

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (14)..(14)
 50 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(22)
 55 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (27)..(29)
 60 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (35)..(36)
 65

<223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <220>
 <221> misc_feature
 5 <222> (38)..(38)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <400> 90
 gcagagggac acangaggac nnggggnna gccgnngngg 40
 10 <210> 91
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 15 <220>
 <223> Sintético
 <220>
 20 <221> misc_feature
 <222> (5)..(5)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <220>
 25 <221> misc_feature
 <222> (14)..(14)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <220>
 30 <221> misc_feature
 <222> (21)..(22)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <220>
 35 <221> misc_feature
 <222> (27)..(29)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <220>
 40 <221> misc_feature
 <222> (35)..(36)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <220>
 45 <221> misc_feature
 <222> (38)..(38)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <400> 91
 50 gcagngggac acangaggac nnggggnna gccgnngngg 40
 <210> 92
 <211> 40
 <212> ADN
 55 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintético
 <220>
 60 <221> misc_feature
 <222> (5)..(5)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <220>
 65

<221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 5 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (14)..(14)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 10 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (22)..(23)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (28)..(30)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 20 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (36)..(37)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 25 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (39)..(39)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 30 <400> 92
 gcagngggan acangaggac gnnggggnnn agccgnngng 40
 <210> 93
 <211> 40
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintético
 40 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 45 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (14)..(14)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 50 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (22)..(23)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 55 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (28)..(30)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 60 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (36)..(37)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 65

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (39)..(39)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 5
 <400> 93
 gnagcgggac acangaggac gnnnggggnnn agccgnngng 40

 <210> 94
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 10

 <220>
 <223> Sintético
 15

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (14)..(14)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 20

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(22)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 25

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (28)..(30)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 30

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (36)..(37)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 35

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (39)..(39)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 40

 <400> 94
 ggagcggggc acangaggac nnggggggnnn agccgnngng 40

 <210> 95
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 45

 <220>
 <223> Sintético
 50

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (14)..(14)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 55

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(22)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 60

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (28)..(30)
 65

<223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <220>
 <221> misc_feature
 5 <222> (36)..(37)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <220>
 <221> misc_feature
 10 <222> (39)..(39)
 <223> n e s a , c , g , o t
 <220>
 <221> misc_feature
 15 <222> (40)..(40)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <400> 95
 20 gcagcgggac acangaggac nngggggnnn agccgnngng 40
 <210> 96
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 25 <220>
 <223> Sintético
 <220>
 <221> misc_feature
 30 <222> (13)..(13)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <220>
 <221> misc_feature
 35 <222> (15)..(15)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <220>
 <221> misc_feature
 40 <222> (22)..(23)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <220>
 <221> misc_feature
 45 <222> (28)..(30)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <220>
 <221> misc_feature
 50 <222> (37)..(38)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <220>
 <221> misc_feature
 55 <222> (40)..(40)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <400> 96
 60 gcagcgggac acnangagga cnngggggnnn aggccgnngn 40
 <210> 97
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 65

<220>
 <223> Sintético

5 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (14)..(14)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

10 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(22)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (27)..(29)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

20 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (35)..(36)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

25 <400> 97
 gcagcgggac acangaggac nnggggnna accggn 36

30 <210> 98
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (14)..(14)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

40 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(22)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

45 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (27)..(29)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

50 <400> 98
 gcagcgggac acangaggac nnggggnna g 31

55 <210> 99
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

60 <220>
 <223> Sintético

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (14)..(14)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(22)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 5

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (28)..(30)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 10

<400> 99
 gcagcgggac acangaggac nnggggggnn agc 33

<210> 100
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 15

<220>
 <223> Sintético
 20

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (6)..(6)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 25

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (14)..(14)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 30

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (17)..(17)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 35

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (19)..(19)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 40

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (23)..(24)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 45

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (29)..(31)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 50

<400> 100
 gcagcnggac acangangna cgnnggggnn nagcc 35

<210> 101
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 55

<220>
 <223> Sintético
 60

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (6)..(6)
 65

<223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <220>
 <221> misc_feature
 5 <222> (14)..(14)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <220>
 <221> misc_feature
 10 <222> (17)..(17)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <220>
 <221> misc_feature
 15 <222> (19)..(19)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <220>
 <221> misc_feature
 20 <222> (23)..(24)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <220>
 <221> misc_feature
 25 <222> (29)..(31)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <400> 101
 gcagcnggac acangangna cgnnggggnn nagcc 35
 30
 <210> 102
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35
 <220>
 <223> Sintético
 <220>
 <221> misc_feature
 40 <222> (6)..(6)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <220>
 <221> misc_feature
 45 <222> (11)..(11)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <220>
 <221> misc_feature
 50 <222> (15)..(15)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <220>
 <221> misc_feature
 55 <222> (21)..(22)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <220>
 <221> misc_feature
 60 <222> (27)..(29)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (35)..(36)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 5

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (38)..(38)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 10

<400> 102
 ggaacnagcg ngganggggc nnggggnna gccgnnangc 40

<210> 103
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 15

<220>
 <223> Sintético
 20

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (5)..(5)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 25

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 30

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (14)..(14)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 35

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(22)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 40

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (27)..(29)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 45

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (35)..(36)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 50

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (38)..(38)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 55

<400> 103
 gaacnagcgn gganggggc nnggggnna gccgnnangc 40

<210> 104
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 60

<220>
 65

<223> Sintético
 <220>
 <221> misc_feature
 5 <222> (6)..(6)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <220>
 <221> misc_feature
 10 <222> (11)..(11)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <220>
 <221> misc_feature
 15 <222> (14)..(14)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <220>
 <221> misc_feature
 20 <222> (21)..(22)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <220>
 <221> misc_feature
 25 <222> (27)..(29)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <220>
 <221> misc_feature
 30 <222> (35)..(36)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <220>
 <221> misc_feature
 35 <222> (38)..(38)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <400> 104
 ggaachnagcg ngangggggc nnggggnna gccgnnangc 40
 40
 <210> 105
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 45
 <220>
 <223> Sintético
 <220>
 <221> misc_feature
 50 <222> (1)..(1)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <220>
 <221> misc_feature
 55 <222> (7)..(7)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <220>
 <221> misc_feature
 60 <222> (12)..(12)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <220>
 <221> misc_feature
 65

<222> (16)..(16)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

 <220>
 5 <221> misc_feature
 <222> (23)..(24)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

 <220>
 10 <221> misc_feature
 <222> (28)..(30)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

 <220>
 15 <221> misc_feature
 <222> (36)..(37)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

 <220>
 20 <221> misc_feature
 <222> (39)..(39)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

 <400> 105
 25 nggaacnagc gnggangggg gcnnngggnn agccgnnang 40

 <210> 106
 <211> 40
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintético

 <220>
 35 <221> misc_feature
 <222> (6)..(6)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

 <220>
 40 <221> misc_feature
 <222> (11)..(11)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

 <220>
 45 <221> misc_feature
 <222> (15)..(15)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

 <220>
 50 <221> misc_feature
 <222> (22)..(23)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

 <220>
 55 <221> misc_feature
 <222> (28)..(30)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

 <220>
 60 <221> misc_feature
 <222> (36)..(37)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

 <220>
 65

<221> misc_feature
 <222> (39)..(39)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

5 <400> 106
 ggaacnagcg nggangggggg cnnggggnnn agccannang 40

<210> 107
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

10

<220>
 <223> Sintético

15

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (6)..(6)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

20

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (11)..(11)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

25

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (15)..(15)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

30

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (22)..(23)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

35

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (28)..(30)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

40

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (36)..(37)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

45

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (39)..(39)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

50

<400> 107
 ggaacnagcg nggangggggg cnnggggnnn agccgnnang 40

<210> 108
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

55

<220>
 <223> Sintético

60

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (6)..(6)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

65

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (11)..(11)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 5

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (15)..(15)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 10

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (22)..(23)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 15

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (28)..(30)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 20

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (36)..(37)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 25

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (39)..(39)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 30

<400> 108
 ggaachagcg ngganggggg cnnggagann agccgnnang 40

<210> 109
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35

<220>
 <223> Sintético
 40

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (6)..(6)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 45

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (11)..(11)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 50

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (15)..(15)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 55

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (22)..(23)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 60

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (28)..(30)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 65

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (36)..(37)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 5

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (39)..(39)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 10

<400> 109
 ggaachagcg ngganggggg cnnggggnnn aaccgnnang 40

<210> 110
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 15

<220>
 <223> Sintético
 20

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (6)..(6)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 25

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (11)..(11)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 30

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (15)..(15)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 35

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (22)..(23)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 40

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (28)..(30)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 45

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (36)..(37)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 50

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (39)..(39)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 55

<400> 110
 gaaachagcg ngganggggg cnnggggnnn agccgnnang 40

<210> 111
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 60

<220>
 <223> Sintético

5 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (6)..(6)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

10 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (11)..(11)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (15)..(15)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

20 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (22)..(23)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

25 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (28)..(30)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

30 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (36)..(37)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

35 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (39)..(39)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

40 <400> 111
 ggaacnagcg ngganggggg cnnggggnnn agccgnngng 40

<210> 112
 <211> 40
 <212> ADN
 45 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintético

50 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (6)..(6)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

55 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (11)..(11)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

60 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (15)..(15)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

65 <220>

<221> misc_feature
 <222> (22)..(23)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 5 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (28)..(30)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 10 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (36)..(37)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (39)..(39)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 20 <400> 112
 ggagcnagcg nggngggga cnnggggnn agccgnngng 40
 <210> 113
 <211> 40
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintético
 30 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (6)..(6)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 35 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (11)..(11)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 40 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (15)..(15)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 45 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (22)..(23)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 50 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (28)..(30)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 55 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (36)..(37)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 60 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (39)..(39)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 65

<400> 113
 ggaacnagca cgganggggg cngggggnn agccgnnang 40

5 <210> 114
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Sintético

15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (6)..(6)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

20 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (11)..(11)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

25 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (15)..(15)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

30 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (22)..(23)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

35 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (28)..(30)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

40 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (32)..(32)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

45 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (36)..(37)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

50 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (39)..(39)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

<400> 114
 ggaacnagcg ngganggggg cngggggnn anccgnnana 40

55 <210> 115
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

60 <220>
 <223> Sintético

65 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (6)..(6)

<223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <220>
 <221> misc_feature
 5 <222> (11)..(11)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <220>
 <221> misc_feature
 10 <222> (15)..(15)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <220>
 <221> misc_feature
 15 <222> (22)..(23)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <220>
 <221> misc_feature
 20 <222> (27)..(28)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <220>
 <221> misc_feature
 25 <222> (31)..(31)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <400> 115
 30 ggaachnagcg ngganggggg cnggggnag n 31
 <210> 116
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35 <220>
 <223> Sintético
 <220>
 40 <221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <220>
 45 <221> misc_feature
 <222> (12)..(12)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <220>
 50 <221> misc_feature
 <222> (14)..(14)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <220>
 55 <221> misc_feature
 <222> (16)..(16)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <220>
 60 <221> misc_feature
 <222> (23)..(24)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <220>
 65 <221> misc_feature
 <222> (29)..(31)

<223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <220>
 <221> misc_feature
 5 <222> (37)..(38)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <220>
 <221> misc_feature
 10 <222> (40)..(40)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <400> 116
 gcagaangcg gnanangagg acnnggaggn nagccgnngn 40
 15 <210> 117
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 20 <220>
 <223> Sintético
 <220>
 25 <221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <220>
 30 <221> misc_feature
 <222> (12)..(12)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <220>
 35 <221> misc_feature
 <222> (14)..(14)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <220>
 40 <221> misc_feature
 <222> (16)..(16)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <220>
 45 <221> misc_feature
 <222> (23)..(24)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <220>
 50 <221> misc_feature
 <222> (29)..(31)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <220>
 55 <221> misc_feature
 <222> (37)..(38)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <220>
 60 <221> misc_feature
 <222> (40)..(40)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <400> 117
 gcagaangcg gnanangagg acnnggggn nagccgnngn 40
 65

<210> 118
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> Sintético
 <220>
 10 <221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <220>
 15 <221> misc_feature
 <222> (12)..(12)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <220>
 20 <221> misc_feature
 <222> (14)..(14)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <220>
 25 <221> misc_feature
 <222> (16)..(16)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <220>
 30 <221> misc_feature
 <222> (23)..(23)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <220>
 35 <221> misc_feature
 <222> (24)..(24)
 <223> n es a, c, g, o t
 <220>
 40 <221> misc_feature
 <222> (29)..(31)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <220>
 45 <221> misc_feature
 <222> (37)..(38)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <220>
 50 <221> misc_feature
 <222> (40)..(40)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <400> 118
 55 gcagaangcg gnanangggg acnnggggn ngccgngn 40
 <210> 119
 <211> 40
 <212> ADN
 60 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintético
 65 <220>

<221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

5

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (12)..(12)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

10

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (14)..(14)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

15

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (16)..(16)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

20

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (23)..(24)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

25

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (29)..(31)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

30

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (33)..(33)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

35

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (37)..(38)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

40

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (40)..(40)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

45

<400> 119
 gcagaangcg gnanangggg gcnnnggggn nanccgngn 40

<210> 120
 <211> 40

50

<212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintético

55

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

60

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (12)..(12)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

65

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (14)..(14)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 5

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (16)..(16)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 10

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (23)..(24)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 15

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (29)..(31)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 20

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (37)..(38)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 25

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (40)..(40)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 30

<400> 120
 gcagaangcg gnanangggg gcnnggggnn nagccanngn 40

<210> 121
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35

<220>
 <223> Sintético
 40

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 45

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (12)..(12)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 50

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (14)..(14)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 55

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (16)..(16)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 60

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (23)..(24)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 65

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (29)..(31)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 5

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (37)..(38)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 10

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (40)..(40)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 15

<400> 121
 gcagaangag gnanangagg acnnggggnn nagccgngn 40

<210> 122
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 20

<220>
 <223> Sintético
 25

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 30

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (12)..(12)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 35

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (14)..(14)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 40

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (16)..(16)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 45

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (23)..(24)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 50

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (29)..(31)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 55

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (33)..(33)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 60

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (37)..(38)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 65

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (40)..(40)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 5
 <400> 122
 gcagaangcg gnanangggg gcnnnggggn nanccggnan 40

 <210> 123
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 10

 <220>
 <223> Sintético
 15

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 20

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (12)..(12)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 25

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (14)..(14)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 30

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (16)..(16)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 35

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (23)..(24)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 40

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (29)..(31)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 45

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (37)..(38)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 50

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (40)..(40)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 55

 <400> 123
 gcagaangcg gnanangggg gcnnnggggn nagccggnan 40

 <210> 124
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 60

 <220>
 65

<223> Sintético
 <220>
 <221> misc_feature
 5 <222> (7)..(7)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <220>
 <221> misc_feature
 10 <222> (12)..(12)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <220>
 <221> misc_feature
 15 <222> (14)..(14)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <220>
 <221> misc_feature
 20 <222> (16)..(16)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <220>
 <221> misc_feature
 25 <222> (23)..(16)
 <223> 25
 <220>
 <221> misc_feature
 30 <222> (23)..(25)
 <223> n es a, c, g, o t
 <220>
 <221> misc_feature
 35 <222> (29)..(31)
 <223> 25
 <220>
 <221> misc_feature
 40 <222> (37)..(38)
 <223> 25
 <220>
 <221> misc_feature
 45 <222> (40)..(40)
 <223> 25
 <400> 124
 gcagaangcg gnanangggg gcnnggggn nagccgnan 40
 50
 <210> 125
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 55
 <220>
 <223> Sintético
 <220>
 <221> misc_feature
 60 <222> (7)..(7)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <220>
 <221> misc_feature
 65

<222> (12)..(12)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

 <220>
 5 <221> misc_feature
 <222> (14)..(14)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

 <220>
 10 <221> misc_feature
 <222> (16)..(16)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

 <220>
 15 <221> misc_feature
 <222> (23)..(24)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

 <220>
 20 <221> misc_feature
 <222> (30)..(32)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

 <220>
 25 <221> misc_feature
 <222> (38)..(39)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

 <400> 125
 30 gcagaangcg gnanangggg acnngggggn nnagccgnng 40

 <210> 126
 <211> 40
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintético

 <220>
 40 <221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

 <220>
 45 <221> misc_feature
 <222> (12)..(12)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

 <220>
 50 <221> misc_feature
 <222> (14)..(14)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

 <220>
 55 <221> misc_feature
 <222> (17)..(17)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

 <220>
 60 <221> misc_feature
 <222> (24)..(25)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

 <220>
 65

<221> misc_feature
 <222> (30)..(32)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

5

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (38)..(39)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

10

<400> 126
 gcagaangcg gnanagnggg ggcnnnggggn nnagccgna 40

<210> 127
 <211> 37

15

<212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintético

20

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

25

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (8)..(8)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

30

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (13)..(13)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

35

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (15)..(15)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

40

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (17)..(17)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

45

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (24)..(25)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

50

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (30)..(32)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

55

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (34)..(34)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

60

<400> 127
 ngcagaangc ggnananggg ggcnnnggggn nnanccg 37

<210> 128
 <211> 40

65

ES 2 610 159 T3

<212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 5 <223> Sintético

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 10 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 15 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (8)..(9)
 20 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (11)..(11)
 25 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (18)..(19)
 30 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (24)..(25)
 35 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (28)..(28)
 40 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (32)..(33)
 45 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (35)..(35)
 50 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

 <400> 128
 gngncacnng nggggagngng gggngngancc gnngnccgcc 40

 55 <210> 129
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 60 <220>
 <223> Sintético

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 65

<223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <220>
 <221> misc_feature
 5 <222> (4)..(4)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <220>
 <221> misc_feature
 10 <222> (8)..(9)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <220>
 <221> misc_feature
 15 <222> (11)..(11)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <220>
 <221> misc_feature
 20 <222> (18)..(19)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <220>
 <221> misc_feature
 25 <222> (24)..(25)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <220>
 <221> misc_feature
 30 <222> (28)..(28)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <220>
 <221> misc_feature
 35 <222> (32)..(33)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <220>
 <221> misc_feature
 40 <222> (35)..(36)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <400> 129
 gngncacnng nggggagnng gggngnanc cc gnnngnncgcc 40
 45
 <210> 130
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 50
 <220>
 <223> Sintético
 <220>
 <221> misc_feature
 55 <222> (2)..(2)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <220>
 <221> misc_feature
 60 <222> (4)..(2)
 <223> 4
 <220>
 <221> misc_feature
 65

<222> (4)..(4)
 <223> n es a, c, g, o t

5 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (8)..(9)
 <223> 4

10 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (11)..(11)
 <223> 4

15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (18)..(19)
 <223> 4

20 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (24)..(25)
 <223> 4

25 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (28)..(28)
 <223> 4

30 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (32)..(28)
 <223> 33

35 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (32)..(33)
 <223> n es a, c, g, o t

40 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (35)..(36)
 <223> 33

45 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (37)..(37)
 <223> n es a, c, g, o t

50 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (40)..(40)
 <223> 33

55 <400> 130
 gngncacnng nggggagnng gggnggancc gnngnncgn 40

60 <210> 131
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintético

65 <220>

<221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

5

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

10

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (8)..(8)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

15

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (11)..(11)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

20

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (18)..(19)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

25

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (24)..(25)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

30

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (28)..(28)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

35

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (32)..(33)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

40

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (35)..(36)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

45

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (40)..(40)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

50

<400> 131
 gngncacncg nggggagnng gggngnanc cc gnnngnncgcn 40

<210> 132
 <211> 40

55

<212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintético

60

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

65

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 5

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (8)..(9)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 10

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (11)..(11)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 15

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (18)..(19)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 20

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (24)..(25)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 25

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (28)..(28)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 30

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (33)..(33)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 35

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (35)..(36)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 40

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (40)..(40)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 45

<400> 132
 gngncacnng nggggagngng gggngancc aangncgcn 40

<210> 133
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 50

<220>
 <223> Sintético
 55

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 60

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 65

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (8)..(9)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 5

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (11)..(11)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 10

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (18)..(19)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 15

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (24)..(25)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 20

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (28)..(28)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 25

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (32)..(33)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 30

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (35)..(35)
 <223> n e s a , c , g , o t
 35

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (36)..(37)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 40

<400> 133
 gngncacnng nggggagng gggngncc gngnncgc 40

<210> 134
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintético
 50

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 55

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 60

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (8)..(9)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 65

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (11)..(11)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 5

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (18)..(20)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 10

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (24)..(25)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 15

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (27)..(27)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 20

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (29)..(29)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 25

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (33)..(34)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 30

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (37)..(39)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 35

<400> 134
 gngncacnng nggggagnnn gggngnanc cgnncgnnnc 40

<210> 135
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 40

<220>
 <223> Sintético
 45

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (15)..(15)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 50

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (20)..(20)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 55

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (23) .. (24)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 60

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (29) .. (31)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 65

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (37)..(38)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 5

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (40)..(40)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 10

<400> 135
 ggcgacgcg acagnggggn agnnggggnn naaccgnngn 40

<210> 136
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 15

<220>
 <223> Sintético
 20

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (14)..(14)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 25

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (19) .. (19)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 30

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (22)..(23)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 35

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (28)..(30)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 40

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (36)..(37)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 45

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (39) .. (39)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 50

<400> 136
 ggcgacgcg gcanagggn gnggggnn aaccngngc 40

<210> 137
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 55

<220>
 <223> Sintético
 60

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (13)..(13)
 65

<223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <220>
 <221> misc_feature
 5 <222> (18)..(18)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <220>
 <221> misc_feature
 10 <222> (21) .. (22)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <220>
 <221> misc_feature
 15 <222> (27) .. (29)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <220>
 <221> misc_feature
 20 <222> (35)..(36)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <220>
 <221> misc_feature
 25 <222> (38)..(38)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <400> 137
 30 gcgacgcgcg canggggnag nnggggnna acggnngncg 40
 <210> 138
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35 <220>
 <223> Sintético
 <220>
 40 <221> misc_feature
 <222> (9) .. (9)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <220>
 45 <221> misc_feature
 <222> (16)..(17)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <220>
 50 <221> misc_feature
 <222> (22)..(24)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <220>
 55 <221> misc_feature
 <222> (30)..(31)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <220>
 60 <221> misc_feature
 <222> (33)..(33)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <400> 138
 65 gaccaacang aggacnnggg gnnnagccgn ngnggcacag 40

<210> 139
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> Sintético
 <220>
 10 <221> misc_feature
 <222> (9)..(9)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <220>
 15 <221> misc_feature
 <222> (16)..(17)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <220>
 20 <221> misc_feature
 <222> (22)..(24)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <220>
 25 <221> misc_feature
 <222> (30)..(31)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <220>
 30 <221> misc_feature
 <222> (33)..(34)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <400> 139
 35 gaccaacang aggacnnggg gnnnagccgn ngnngcacag 40
 <210> 140
 <211> 40
 <212> ADN
 40 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintético
 <220>
 45 <221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <220>
 50 <221> misc_feature
 <222> (12)..(12)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <220>
 55 <221> misc_feature
 <222> (19)..(20)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <220>
 60 <221> misc_feature
 <222> (25)..(25)
 <223> n es a, c, g, o t
 65 <220>

<221> misc_feature
 <222> (26)..(28)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

5

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (33)..(33)
 <223> n es a, c, g, o t

10

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (34)..(35)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

15

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (36)..(36)
 <223> n es a, c, g, o t

20

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (37)..(37)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

25

<400> 140
 gggaagcgan angaggacnn ggggnnnagc cgngnggca 40

<210> 141
 <211> 40

30

<212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintético

35

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

40

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (12)..(12)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

45

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (19)..(20)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

50

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (25)..(27)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

55

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (29)..(29)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

60

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (33)..(34)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

65

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (36)..(36)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 5
 <400> 141
 ggggaagcgan angaggagann ggggnnnanc cgnngncaac 40

 <210> 142
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 10

 <220>
 <223> Sintético
 15

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (5)..(5)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 20

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (14)..(14)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 25

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(22)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 30

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (27)..(29)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 35

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (31)..(31)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 40

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (35)..(36)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 45

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (38)..(38)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 50

 <400> 142
 ggagnagga aaanggggag nnggggnna nccgngnca 40
 55
 <210> 143
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 60

 <220>
 <223> Sintético

 <220>
 <221> misc_feature

<222> (3)..(4)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

 <220>
 5 <221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

 <220>
 10 <221> misc_feature
 <222> (14)..(14)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

 <220>
 15 <221> misc_feature
 <222> (21)..(21)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

 <220>
 20 <221> misc_feature
 <222> (27)..(29)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

 <220>
 25 <221> misc_feature
 <222> (31)..(31)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

 <220>
 30 <221> misc_feature
 <222> (35)..(36)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

 <220>
 35 <221> misc_feature
 <222> (38)..(38)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

 <400> 143
 40 ganngcngga gganggggag ngggggnnna nccgnngnca 40

 <210> 144
 <211> 40
 <212> ADN
 45 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintético

 <220>
 50 <221> misc_feature
 <222> (3)..(4)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

 <220>
 55 <221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

 <220>
 60 <221> misc_feature
 <222> (14)..(14)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

 <220>
 65

<221> misc_feature
 <222> (21)..(22)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

5

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (27)..(29)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

10

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (31)..(31)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

15

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (35)..(36)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

20

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (38)..(38)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

25

<400> 144
 ganngcngga gganggggag nnggggnna nccgngnca 40

30

<210> 145
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

35

<220>
 <223> Sintético

40

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(4)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

45

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

50

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (14)..(14)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

55

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(22)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

60

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (27)..(29)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

65

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (35)..(36)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (38)..(38)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 5
 <400> 145
 ganngcnngga ggangaggac nnggggnna gccgnngngg 40

 <210> 146
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 10

 <220>
 <223> Sintético
 15

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (12)..(12)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 20

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (14)..(14)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 25

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (22)..(22)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 30

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (27)..(29)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 35

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (35)..(36)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 40

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (38)..(38)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 45

 <400> 146
 gccggggccg cnangaggac angggggnna gccgnngngg 40
 50
 <210> 147
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintético
 55

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 60

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (12)..(12)
 65

<223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (14)..(14)
 5 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (16)..(16)
 10 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (23)..(24)
 15 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (29)..(31)
 20 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (37)..(38)
 25 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (40)..(40)
 30 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

 <400> 147
 gcagaangcg ananangggg gcnnnggggnn nagccggnan 40

 35 <210> 148
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 40 <220>
 <223> Sintético

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(3)
 45 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (11)..(11)
 50 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (14)..(14)
 55 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (22)..(23)
 60 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (28)..(29)
 65 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

<223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (36)..(37)
 5 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (39)..(39)
 10 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

 <400> 148
 ggnggcacac ngnggggggg cnnggggng agccgnnang 40

 <210> 149
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 20 <220>
 <223> Sintético

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)..(8)
 25 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (13)..(15)
 30 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(22)
 35 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (24)..(24)
 40 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

 <400> 149
 gaggacnngg ggnnnagccg nngng 25

 45 <210> 150
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 50 <220>
 <223> Sintético

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (6)..(7)
 55 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (12)..(14)
 60 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

 <220>

<221> misc_feature
 <222> (20)..(21)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

5

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (23)..(23)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

10

<400> 150
 aggacnnggg gnnagccgn ngng 24

<210> 151
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

15

<220>
 <223> Sintético

20

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (5)..(6)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

25

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (11)..(13)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

30

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (19)..(20)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

35

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (22)..(22)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

40

<400> 151
 ggacnngggg nnnagccggn gng 23

<210> 152
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

45

<220>
 <223> Sintético

50

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (4)..(5)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

55

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (10)..(12)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

60

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (18)..(19)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

65

- 5
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(21)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
- <400> 152
 gacnnggggn nnagccgnng ng 22
- 10
 <210> 153
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
- 15
 <220>
 <223> Sintético
- 20
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(4)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
- 25
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (9)..(11)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
- 30
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (17)..(18)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
- 35
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (20)..(20)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
- <400> 153
 acnnggggnn nagccgnngn g 21
- 40
 <210> 154
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
- 45
 <220>
 <223> Sintético
- 50
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> una G, T, U, o C.
- 55
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(3)
 <223> Seleccionado independientemente entre un nucleótido modificado, específicamente una pirimidina modificada
- 60
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (5)..(5)
 <223> una A o G
- 65
 <220>
 <221> misc_feature

- <222> (8)..(8)
<223> una A o G
- 5 <220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(9)
<223> una C o G
- 10 <220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(10)
<223> Cualquier base o sin base
- 15 <220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(11)
<223> Seleccionado independientemente entre un nucleótido modificado, específicamente una pirimidina modificada
- 20 <220>
<221> misc_feature
<222> (12)..(12)
<223> Seleccionado independientemente entre un nucleótido modificado, específicamente una pirimidina modificada, o T
- 25 <220>
<221> misc_feature
<222> (17)..(17)
<223> Cualquier base o sin base
- 30 <220>
<221> misc_feature
<222> (18)..(19)
<223> Seleccionado independientemente entre un nucleótido modificado, específicamente una pirimidina modificada
- 35 <220>
<221> misc_feature
<222> (20)..(20)
<223> Seleccionado independientemente entre un nucleótido modificado, específicamente una pirimidina modificada, o T
- 40 <220>
<221> misc_feature
<222> (22)..(22)
<223> una A, G, T, o U
- 45 <220>
<221> misc_feature
<222> (26)..(27)
<223> Seleccionado independientemente entre un nucleótido modificado, específicamente una pirimidina modificada
- 50 <220>
<221> misc_feature
<222> (28)..(28)
<223> Seleccionado independientemente entre un nucleótido modificado, específicamente una pirimidina modificada
- 55 <220>
<221> misc_feature
<222> (28)..(28)
<223> Seleccionado independientemente entre un nucleótido modificado, específicamente una pirimidina modificada
- 60 <220>
<221> misc_feature
<222> (28)..(28)
<223> una A o G
- 65 <220>
<221> misc_feature

ES 2 610 159 T3

<222> (29)..(29)
<223> Seleccionado independientemente entre un nucleótido modificado, específicamente una pirimidina modificada

5 <400> 154
nangngggnnn nnggggnnnn anccgnnnng 30

10 <210> 155
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

15 <220>
<223> Sintético

20 <220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> una G, T, U, o C

25 <220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(3)
<223> Seleccionado independientemente entre un nucleótido modificado, específicamente una pirimidina modificada

30 <220>
<221> misc_feature
<222> (5)..(5)
<223> una A o G

35 <220>
<221> misc_feature
<222> (8)..(8)
<223> una A o G

40 <220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(9)
<223> una C o G

45 <220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(10)
<223> Cualquier base o sin base

50 <220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(12)
<223> Seleccionado independientemente entre un nucleótido modificado, específicamente una pirimidina modificada

55 <220>
<221> misc_feature
<222> (17)..(17)
<223> Cualquier base o sin base

60 <220>
<221> misc_feature
<222> (18)..(20)
<223> Seleccionado independientemente entre un nucleótido modificado, específicamente una pirimidina modificada

65 <220>
<221> misc_feature
<222> (22)..(22)

<223> una A, G, T, o U
 <220>
 <221> misc_feature
 5 <222> (26)..(27)
 <223> Seleccionado independientemente entre un nucleótido modificado, específicamente una pirimidina modificada
 <220>
 10 <221> misc_feature
 <222> (28)..(28)
 <223> una A o G
 <220>
 15 <221> misc_feature
 <222> (29)..(29)
 <223> Seleccionado independientemente entre un nucleótido modificado, específicamente una pirimidina modificada
 20 <400> 155
 nangngggnnn nnggggnnnn anccgnnnng 30
 <210> 156
 <211> 26
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 30 <223> Sintético
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (8)..(9)
 35 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (14)..(16)
 40 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (22)..(23)
 45 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (25)..(25)
 50 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <400> 156
 tgaggacnng gggnnnagcc gnnngng 26
 <210> 157
 <211> 26
 55 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 60 <223> Sintético
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 65 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (9)..(9)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 5

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (14)..(16)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 10

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (22)..(23)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 15

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (25)..(25)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 20

<400> 157
 ngaggactng gggnnnagcc gnnngng 26

<210> 158
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 25

<220>
 <223> Sintético
 30

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 35

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (8)..(8)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 40

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (14)..(16)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 45

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (22)..(23)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 50

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (25)..(25)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 55

<400> 158
 ngaggactng gggnnnagcc gnnngng 26

<210> 159
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 60

<220>
 65

<223> Sintético
 <220>
 <221> misc_feature
 5 <222> (1)..(1)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <220>
 <221> misc_feature
 10 <222> (8)..(9)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <220>
 <221> misc_feature
 15 <222> (15)..(16)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <220>
 <221> misc_feature
 20 <222> (22)..(23)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <220>
 <221> misc_feature
 25 <222> (25)..(25)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <400> 159
 ngaggacnng gggtnnagcc gnngng 26
 30
 <210> 160
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35
 <220>
 <223> Sintético
 <220>
 <221> misc_feature
 40 <222> (1)..(1)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <220>
 <221> misc_feature
 45 <222> (8)..(9)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <220>
 <221> misc_feature
 50 <222> (14)..(14)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <220>
 <221> misc_feature
 55 <222> (16)..(16)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <220>
 <221> misc_feature
 60 <222> (22)..(23)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <220>
 <221> misc_feature
 65

<222> (25)..(25)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

 <400> 160
 5 ngaggacnng gggntnagcc gnnngng 26

 <210> 161
 <211> 26
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintético

 15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

 20 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (8)..(9)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

 25 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (14)..(15)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

 30 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (22)..(23)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

 35 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (25)..(25)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

 40 <400> 161
 ngaggacnng gggnttagcc gnnngng 26

 <210> 162
 <211> 26
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintético

 50 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

 55 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (8)..(9)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

 60 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (14)..(16)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

 65

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (23)..(23)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 5

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (25)..(25)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 10

<400> 162
 ngaggacnng gggnnagcc gtngng 26
 15

<210> 163
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 20

<220>
 <223> Sintético
 25

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 30

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (8)..(9)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 35

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (14)..(16)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 40

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (22)..(22)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 45

<400> 163
 ngaggacnng gggnnagcc gntgng 26
 50

<210> 164
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 55

<220>
 <223> Sintético
 60

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 65

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (8)..(9)

<223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <220>
 <221> misc_feature
 5 <222> (14)..(16)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <220>
 <221> misc_feature
 10 <222> (22)..(23)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 <400> 164
 ngaggacnng gggnnnagcc gnngtg 26
 15
 <210> 165
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 20
 <220>
 <223> Sintético
 <400> 165
 25 ggtctgttt ctctctgtg 20
 <210> 166
 <211> 28
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintético
 35
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(3)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 40
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 45
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (16)..(17)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 50
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (24)..(25)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 55
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (27)..(27)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 60
 <400> 166
 cangaggacn tgggnntag ccgnngng 28
 <210> 167
 <211> 27
 65 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintético
 5
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 10
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (9)..(9)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 15
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (15)..(16)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 20
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (23)..(24)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 25
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (26)..(26)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 30
 <400> 167
 angaggacnt ggggnntagc cgnngng 27
 35
 <210> 168
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 40
 <220>
 <223> Sintético
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 45
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (8)..(8)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 50
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (14)..(15)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 55
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (22)..(23)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 60
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (25)..(25)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 65

ES 2 610 159 T3

<400> 168
ngaggacntg ggnntagcc gnnngng 26

5 <210> 169
<211> 28
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

10 <220>
<223> Sintético

<400> 169
tttttttg tctgttct tctctgtg 28

REIVINDICACIONES

1. Un aptámero compuesto por la secuencia BAZGRGGRSN₍₀₋₁₎ZWGGGGN₍₀₋₁₎ZZWADCCGZZRZG (SEQ ID NO:154), en el que
- 5 B se selecciona de entre una C, una G o una Z;
R se selecciona independientemente de entre una A o una G;
S se selecciona de entre una C o una G;
W se selecciona independientemente de entre una Z o una T;
D se selecciona de entre una A, una G o una Z;
- 10 N se selecciona independientemente de entre cualquier nucleótido de origen natural o modificado; y
Z es una pirimidina modificada;
en donde el aptámero se une a β -NGF con una K_d de 30 nM o menos.
2. El aptámero de la reivindicación 1, en donde dicho aptámero tiene la siguiente secuencia:
- 15 BAZGRGGRSZWGGGGZZWADCCGZZRZG (SEQ ID NO: 45).
3. El aptámero de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el aptámero está compuesto por la secuencia BAZGRGGRSZZGGGGZZADCCGZZRZG (SEQ. ID. NO: 3), o un fragmento de la misma, en donde
- 20 B se selecciona de entre una C, una G o una Z;
R se selecciona independientemente de entre una A o una G;
S se selecciona de entre una C o una G;
25 D se selecciona de entre una A, una G o una Z; y
Z es una pirimidina modificada.
4. El aptámero de la reivindicación 1, en donde el aptámero inhibe la función de β -NGF.
- 30 5. El aptámero de la reivindicación 1, en donde dicho aptámero tiene la capacidad de modular la unión de β -NGF a uno o más de sus receptores celulares.
6. El aptámero de la reivindicación 5 en el que dicho receptor celular se selecciona de entre p75 o TrkA.
- 35 7. El aptámero de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicha pirimidina modificada es una pirimidina modificada en C-5.
8. El aptámero de la reivindicación 7, en el que la pirimidina modificada en C-5 se selecciona de entre el grupo que consiste en la Figura 10.
- 40 9. El aptámero de la reivindicación 8, en el que la pirimidina modificada en C-5 se selecciona de entre el grupo que consiste en 5-(N-bencil-carboxiamida)-2'-desoxiuridina (BndU), 5-(N-isobutilcarboxiamida)-2'-desoxiuridina (iBudU), 5-(N-triptaminocarboxiamida)-2'-desoxiuridina (TrpdU) y 5-(N-naftilmetilcarboxiamida)-2'-desoxiuridina (NapdU).
- 45 10. El aptámero de la reivindicación 8, en el que la pirimidina modificada en C-5 es 5-(N-bencil-carboxiamida)-2'-desoxiuridina (BndU).
11. El aptámero de la reivindicación 1, en el que dicha pirimidina modificada es una pirimidina modificada en C-5 y dicho aptámero incluye al menos una inserción de nucleótido (N) y tiene la siguiente secuencia:
- 50 BAZGRGGRSN₍₀₋₁₎ZZGGGGN₍₀₋₁₎ZZZADCCGZZRZG (SEQ ID NO: 155)
- en la que N se selecciona independientemente de cualquier nucleótido de origen natural o modificado.
- 55 12. El aptámero de la reivindicación 1, en donde el aptámero comprende una secuencia que se selecciona de entre el grupo que consiste en SEQ. ID. NO: 1, 2, 9-44 y 149.
13. El aptámero de la reivindicación 12, en donde el aptámero inhibe la función de β -NGF.
- 60 14. El aptámero de la reivindicación 12, en donde dicho aptámero tiene la capacidad de modular la unión de β -NGF a su uno o más receptores celulares.
15. El aptámero de la reivindicación 14, en el que dicho receptor celular se selecciona de entre p75 o TrkA.
- 65 16. El aptámero de la reivindicación 2, en donde el aptámero es un dímero que comprende dos componentes y en donde dichos dos componentes están unidos.

17. El aptámero de la reivindicación 16, en el que dichos dos componentes están unidos por un hidrocarburo enlazador.
- 5 18. Una composición farmacéutica que comprende un aptámero de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y un vehículo o un excipiente farmacéuticamente aceptables.
19. La composición farmacéutica de la reivindicación 18, que comprende además un diluyente, un agente antimicrobiano, un agente de unión, una carga, un agente humectante, un agente suspensor, un emoliente y un agente emulsionante.
- 10 20. La composición farmacéutica de las reivindicaciones 18 o 19, en donde dicha composición farmacéutica es una formulación tópica que se selecciona de entre el grupo que consiste en una crema, una loción, un ungüento, un gel, un vendaje impregnado, un aerosol, un polvo medicado, un adhesivo medicado y una espuma.
- 15 21. Un aptámero de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1 a 17 para su uso en un método para tratar, prevenir o mejorar una enfermedad mediada por β -NGF.
- 20 22. El aptámero para su uso en un método para tratar, prevenir o mejorar una enfermedad mediada por β -NGF de acuerdo con la reivindicación 21, en donde la enfermedad o la afección mediadas por β -NGF son una en la que la actividad de β -NGF puede producir prurito directa o indirectamente en cualquier estadio del proceso de la enfermedad.
23. El aptámero para su uso en un método para tratar, prevenir o mejorar una enfermedad mediada por β -NGF de acuerdo con la reivindicación 21, en donde la enfermedad o la afección son dermatitis o eccema.
- 25 24. El aptámero para su uso en un método para tratar, prevenir o mejorar una enfermedad mediada por β -NGF de acuerdo con la reivindicación 23 en donde la dermatitis es dermatitis atópica.
- 30 25. El aptámero para su uso en un método para tratar, prevenir o mejorar una enfermedad mediada por β -NGF de acuerdo con la reivindicación 21, en donde el método comprende la administración tópica de dicho aptámero a un sujeto que necesita una dosis terapéuticamente eficaz de dicho aptámero.
26. El aptámero para su uso en un método para tratar, prevenir o mejorar una enfermedad mediada por β -NGF de acuerdo con la reivindicación 21, en donde el método comprende la administración de dicho aptámero a una dosis en el intervalo de aproximadamente 1 μ g a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal por día.
- 35 27. El aptámero para su uso en un método para tratar, prevenir o mejorar una enfermedad mediada por β -NGF de acuerdo con la reivindicación 23, en donde el método comprende la administración de dicho aptámero en combinación con otro agente utilizando en el tratamiento del prurito.

FIG. 1

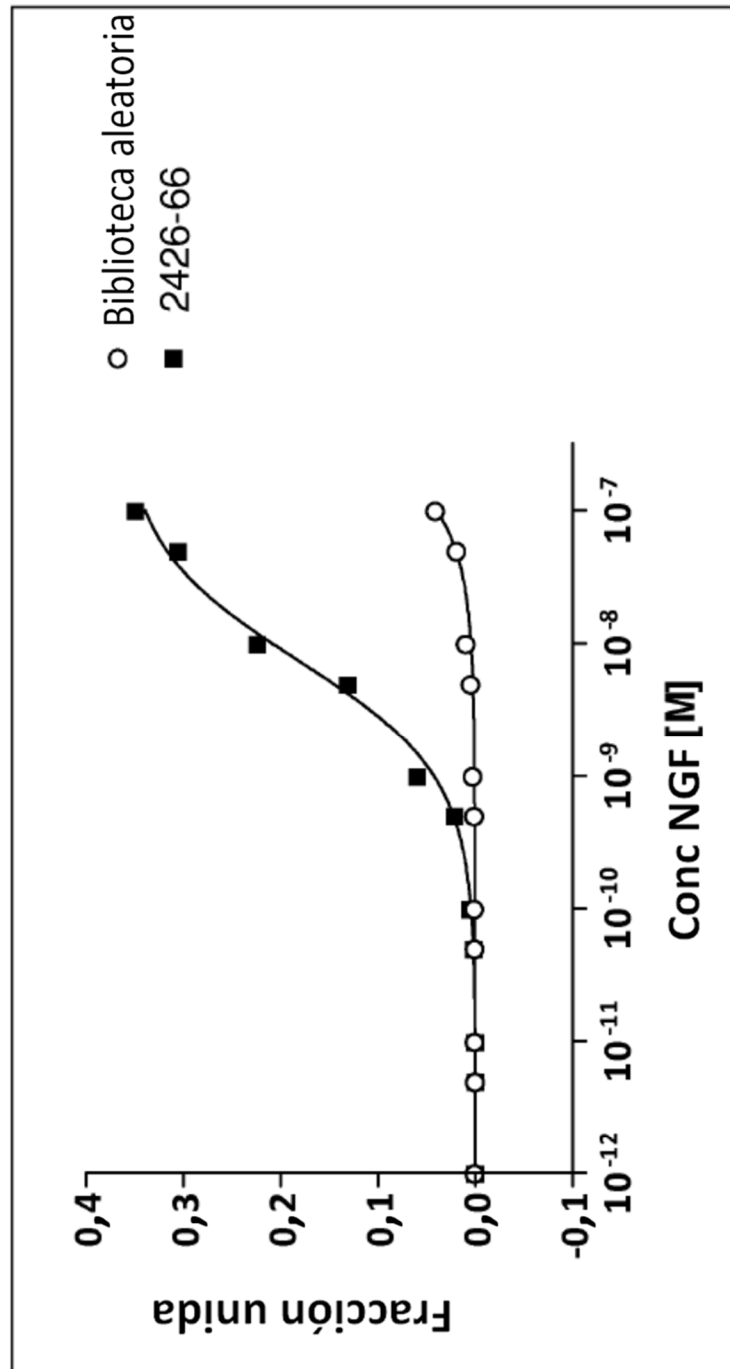


FIG. 2A

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
A	0	92	0	0	61	0	0	75	2	1	0	0	0	1	0	0	0	1	96	13	0	0	3	0	0	20	0	1
Z	23	0	99	1	0	2	3	2	0	97	97	2	0	0	0	99	99	87	0	13	0	0	1	94	93	0	89	7
G	17	7	0	98	38	97	96	20	10	0	2	97	99	98	96	0	0	7	2	71	0	1	89	0	0	71	0	62
C	57	0	0	0	0	0	0	0	86	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	97	93	0	0	0	0	0	6
T											●																	

Consenso	B	A	Z	G	R	G	G	R	S	Z	W	G	G	G	G	Z	Z	W	A	D	C	C	G	Z	Z	R	Z	G
----------	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

La fila (A) indica la frecuencia a la que A se observa en la familia de aptámeros 2426-66 en cada una de las 28 posiciones conservadas
 La fila (Z) indica la frecuencia a la que Z se observa en la familia de aptámeros 2426-66 en cada una de las 28 posiciones conservadas
 La fila (G) indica la frecuencia a la que G se observa en la familia de aptámeros 2426-66 en cada una de las 28 posiciones conservadas
 La fila (C) indica la frecuencia a la que C se observa en la familia de aptámeros 2426-66 en cada una de las 28 posiciones conservadas
 La fila (T) indica las dos únicas posiciones Z conservadas que se pueden sustituir con T sin pérdida de actividad de unión a p-NGF (●)

La fila (Consenso) es la secuencia de consenso para el aptámero con la sustitución Bzdu, en el que:

- Z = U modificada
- B = cualquier nucleótido distinto de A
- R = A o G
- S = C o G
- W = Z o T
- D = cualquier nucleótido distinto de C

FIG. 2B

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	
A	0	92	0	0	0	51	0	0	0	75	2	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	96	13	0	0	0	0	3	0	0	0	20	0	1
Z	23	0	0	99	1	0	1	2	3	2	0	1	97	97	2	0	0	0	0	99	99	87	0	13	0	0	0	0	1	94	93	0	0	89	7
G	17	7	1	0	93	38	0	97	96	20	10	6	0	2	97	99	98	96	3	0	0	7	2	71	0	0	0	1	89	0	0	1	71	0	62
C	57	0	0	0	0	0	0	0	0	0	86	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	97	93	0	0	0	0	0	0	0	6
-	0	0	98	0	0	0	97	0	0	0	91	0	0	0	0	0	0	3	95	0	0	3	0	0	97	1	2	4	4	6	98	6	8	20	

Consenso	B	A	-	Z	G	R	-	G	G	R	S	-	Z	Z	G	G	G	G	-	Z	Z	Z	A	D	-	C	C	G	Z	Z	-	R	Z	G
----------	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

La fila (A) indica la frecuencia a la que A se observa en la familia de aptámeros 2426-66 en cada una de las 34 posiciones conservadas
 La fila (Z) indica la frecuencia a la que Z se observa en la familia de aptámeros 2426-66 en cada una de las 34 posiciones conservadas
 La fila (G) indica la frecuencia a la que G se observa en la familia de aptámeros 2426-66 en cada una de las 34 posiciones conservadas
 La fila (C) indica la frecuencia a la que C se observa en la familia de aptámeros 2426-66 en cada una de las 34 posiciones conservadas
 La fila (-) indica la frecuencia a la que se observa una eliminación en la familia de aptámeros 2426-66 en cada una de las 34 posiciones conservadas

La fila (Consenso) es la secuencia de consenso para el aptámero con la sustitución BzdU, en el que:

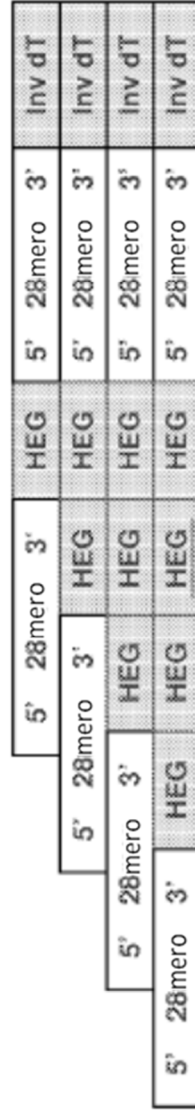
- Z = U modificada
- B = C, G o Z
- R = A o G
- S = C o G
- D = A, G o Z

FIG. 3

Estrategia de dimerización nº 1

Dímeros NGF cabeza a cola

Hexaetilenglicol (HEG) es ~22 Å



X = enlace fosfato azúcar abásico (~3 Å cada uno)

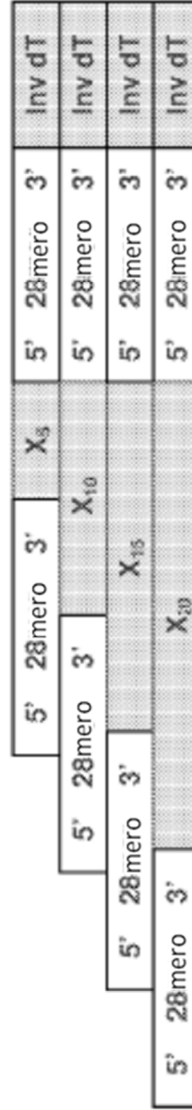
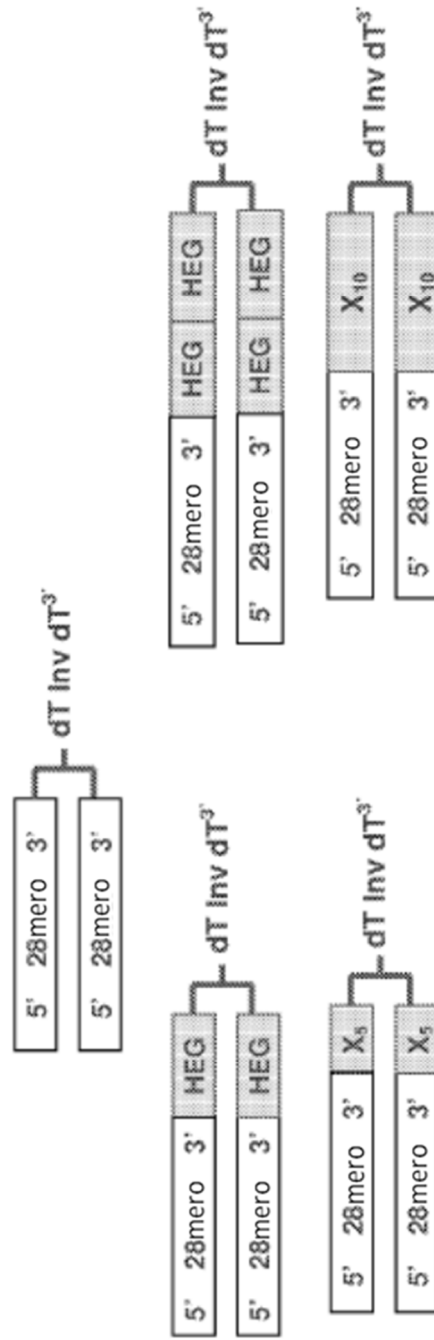


FIG. 4

Estrategia de dimerización nº 2

Dimerización de aptámeros por amidita ramificada



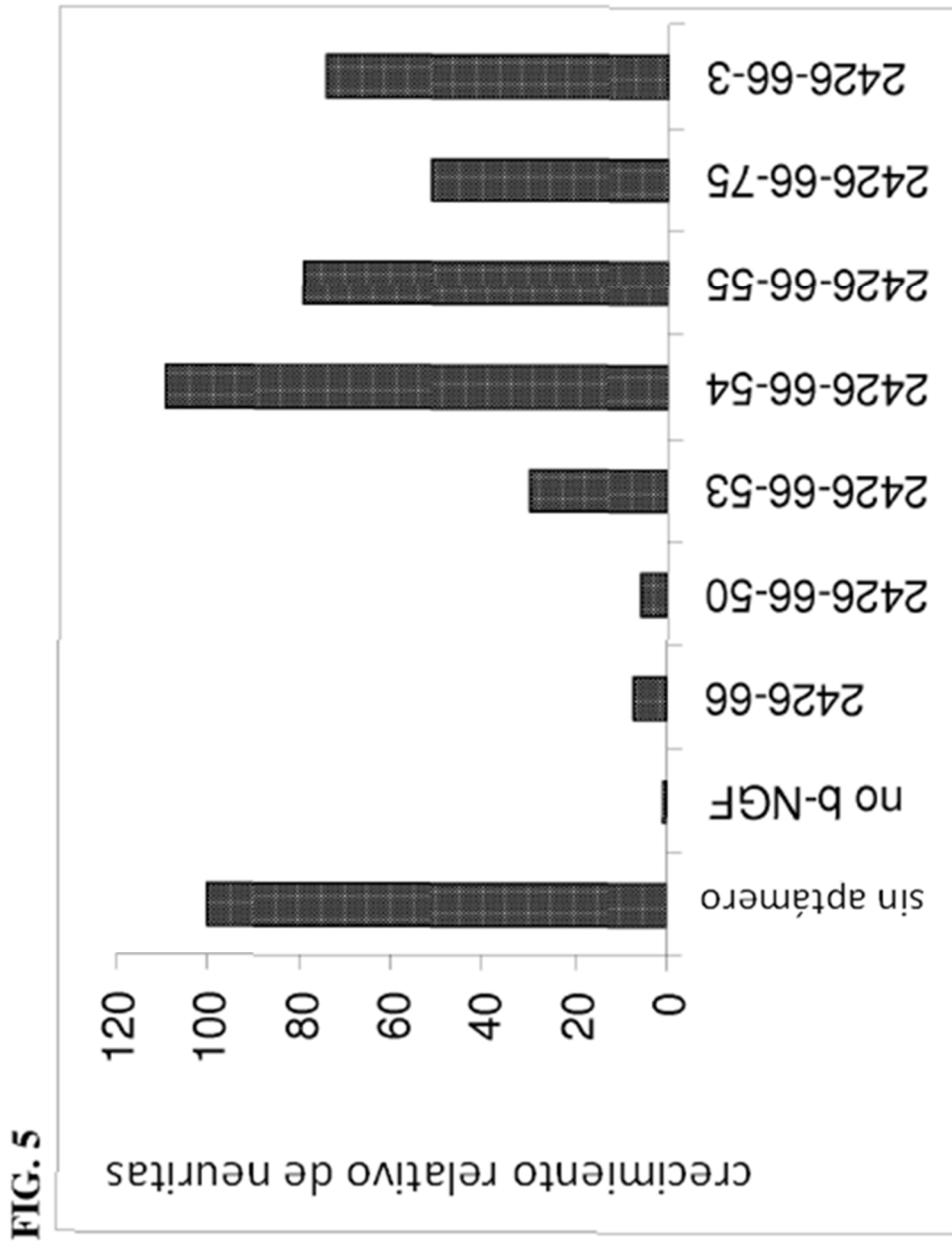


FIG. 5

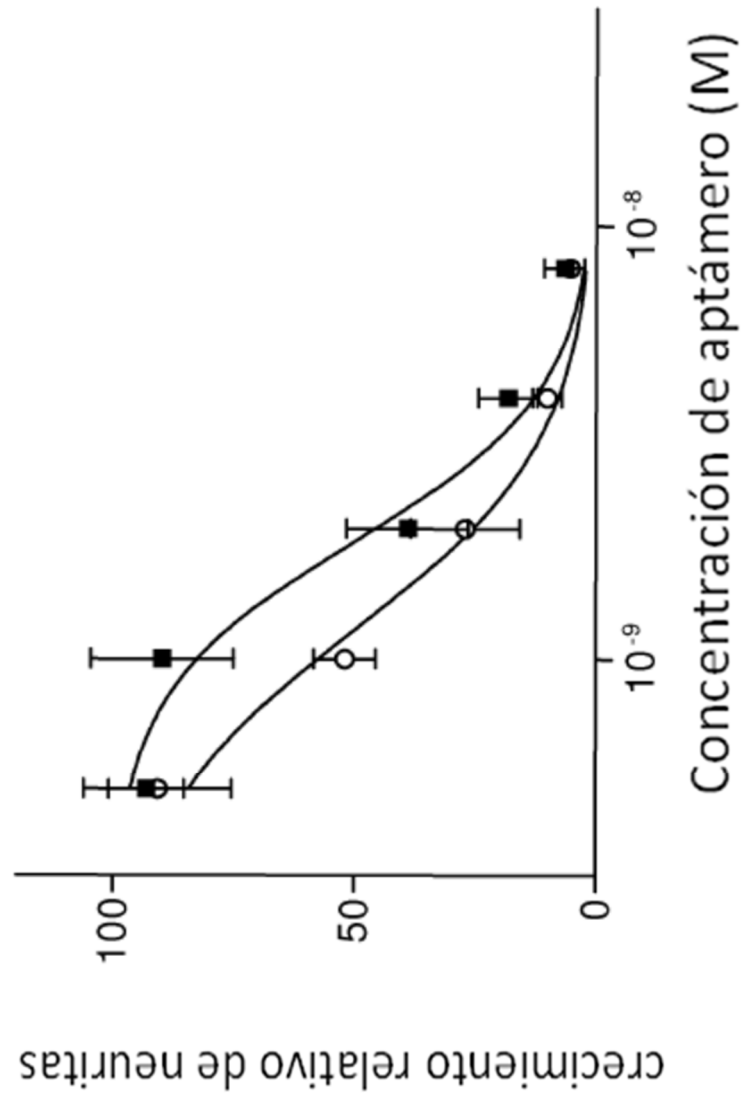


FIG. 6

FIG. 7

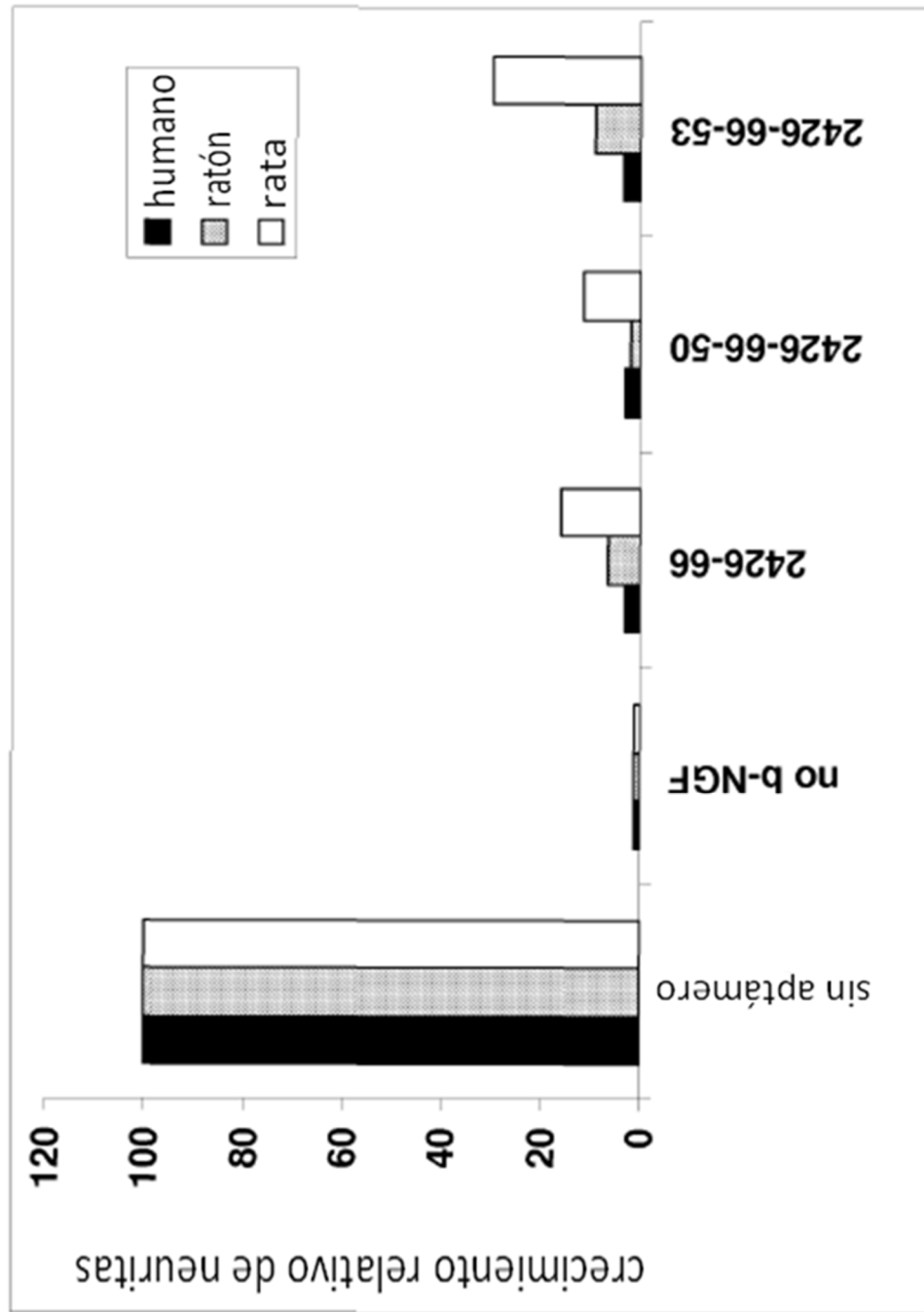
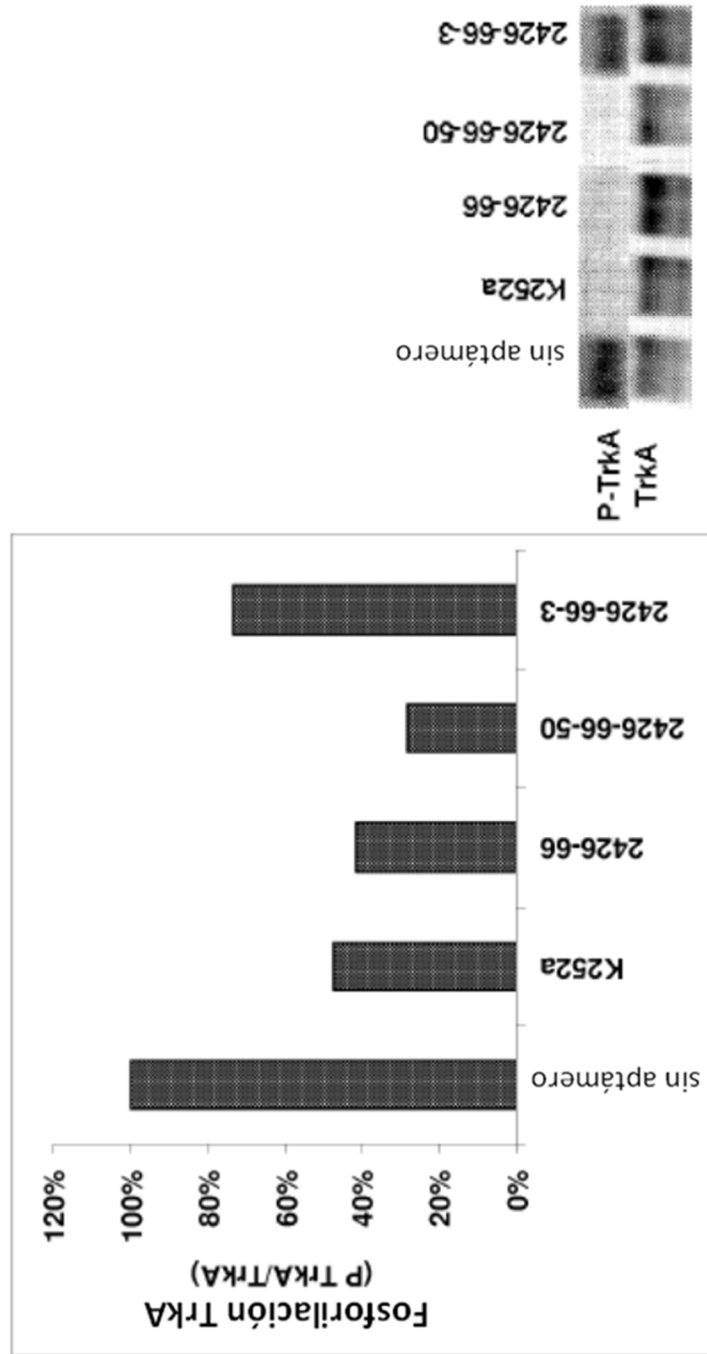


FIG. 8



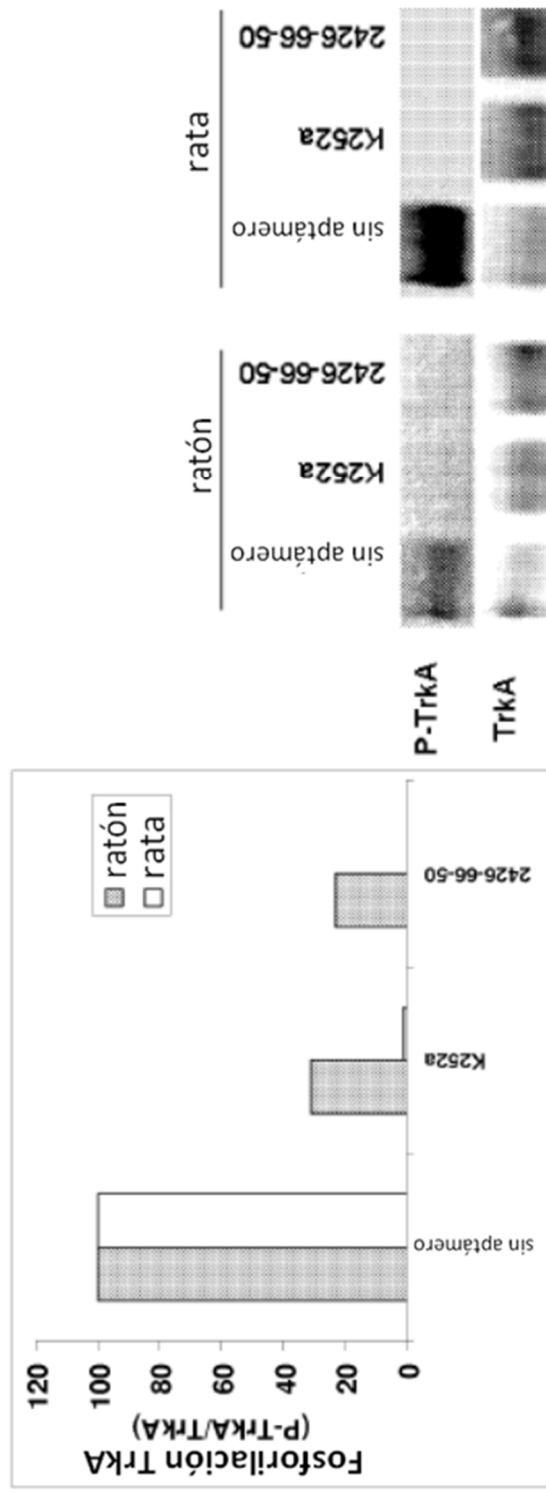
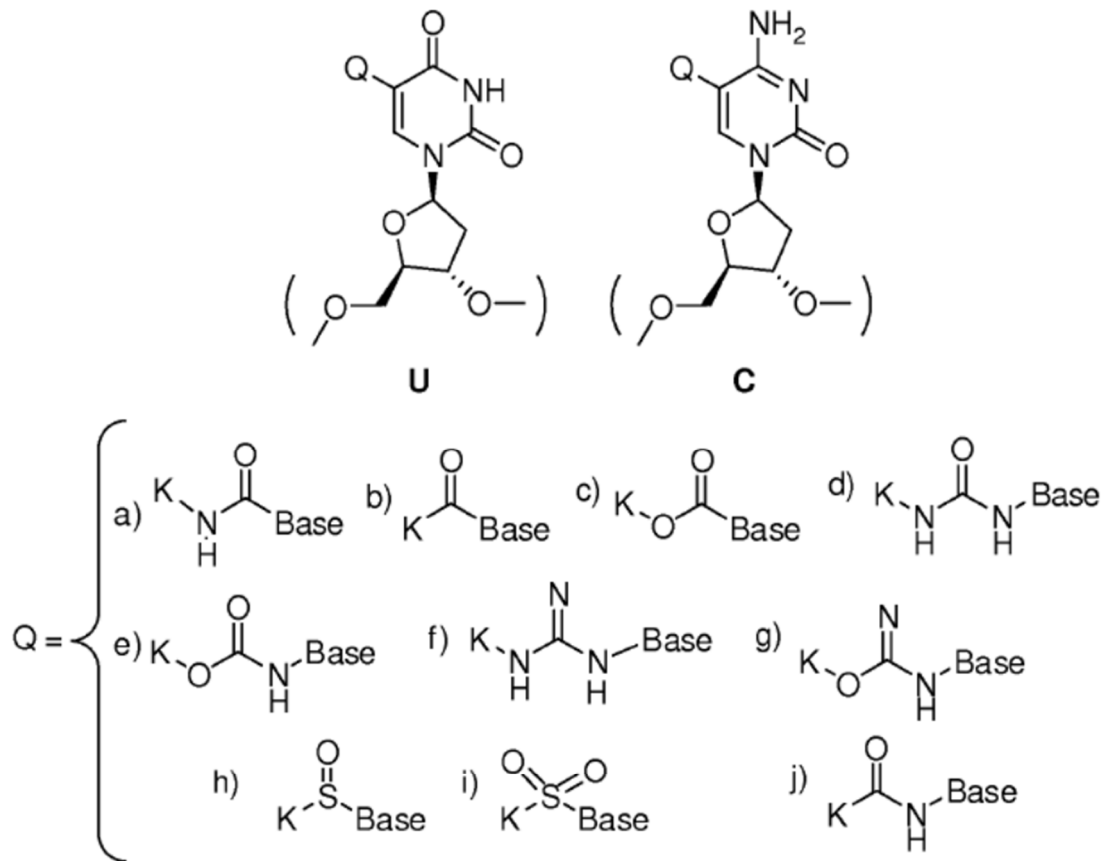


FIG. 9

FIG. 10



Base = Uridina (U) o Citidina (C) (unión en posición 5)

K = grupo R' más $(\text{CH}_2)_n$ grupo de conexión, en el que $n = 0-3$

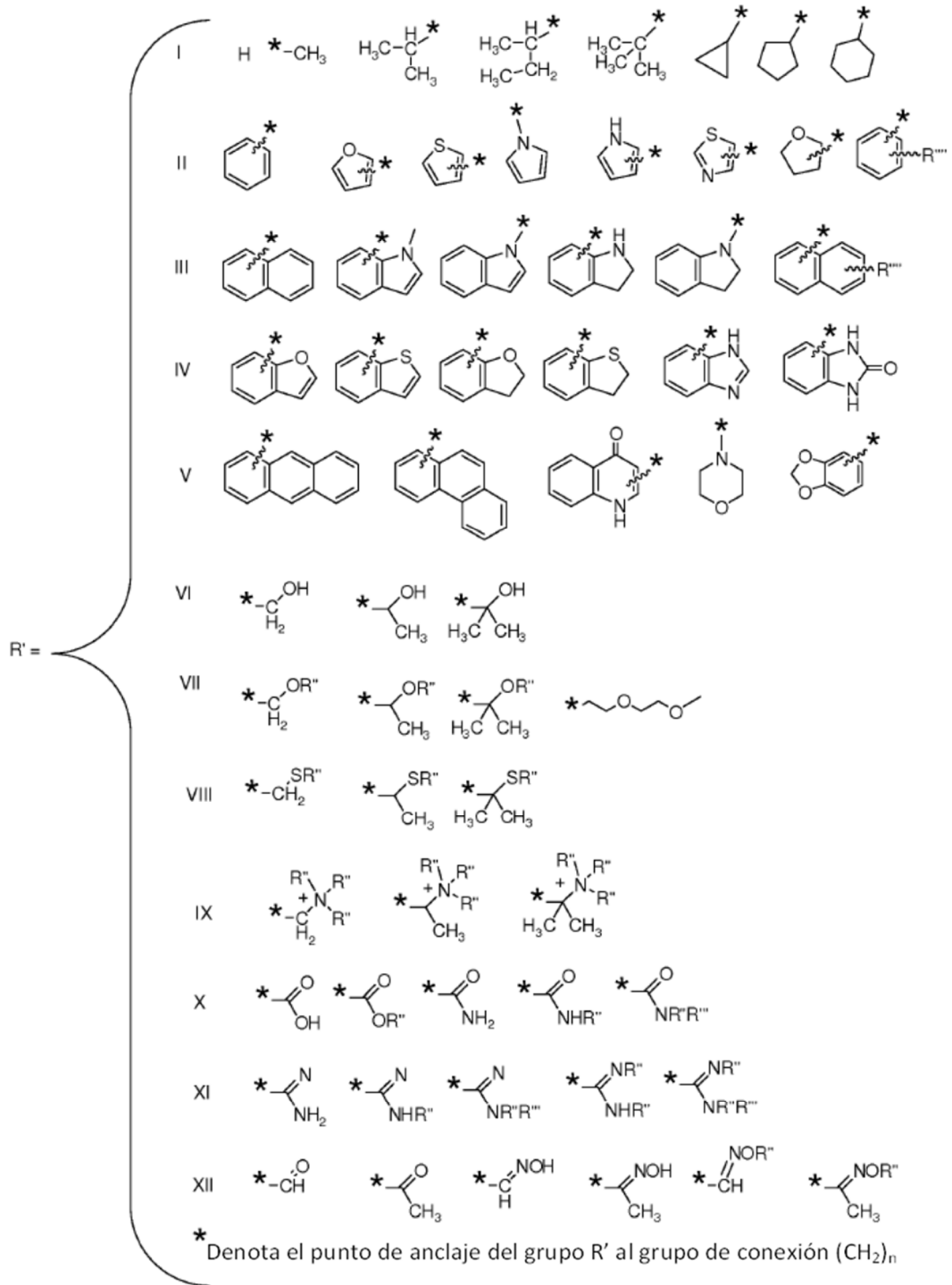


FIG. 10 continuación

FIG. 10 continuación

en el que

R^{''''} se selecciona de entre el grupo que consiste en un alquilo ramificado o lineal (C1-C20); halógeno (F, Cl, Br, I); nitrilo (CN); ácido borónico (BO₂H₂); ácido carboxílico (COOH); éster de ácido carboxílico (COOR^{''}); amida primaria (CONH₂); amida secundaria (CONHR^{''}); amida terciaria (CONR^{''}R^{''''}); sulfonamida (SO₂NH₂); N-alquilsulfonamida (SONHR^{''});

en el que

R^{''}, R^{'''} se seleccionan independientemente de entre un grupo que consiste en un alquilo inferior ramificado o lineal (C1-C2); fenilo (C₆H₁₅); un anillo fenilo R^{''''} sustituido (R^{''''} C₆H₄); en el que R^{''''} se define anteriormente; un ácido carboxílico (COOH); un éster de ácido carboxílico (COOR^{''''}); en el que R^{''''} es un alquilo inferior ramificado o lineal (C1-C20); y un cicloalquilo; en el que R^{''} = R^{'''} = (CH₂)_n;

en el que n = 2-10.

FIG. 11

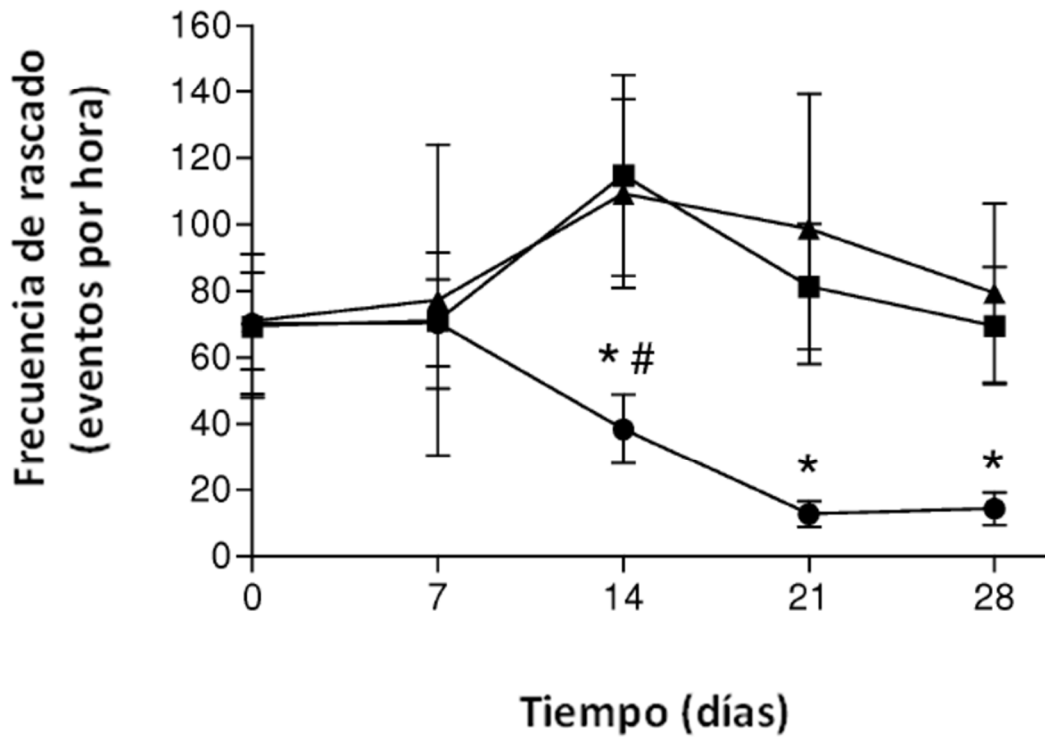


FIG. 12

