

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 682 356**

51 Int. Cl.:

<b>C12N 15/00</b>	(2006.01)	<b>C12N 15/115</b>	(2010.01)
<b>A61K 31/7088</b>	(2006.01)	<b>C12Q 1/68</b>	(2008.01)
<b>A61K 45/00</b>	(2006.01)	<b>G01N 33/53</b>	(2006.01)
<b>A61K 48/00</b>	(2006.01)		
<b>A61P 29/00</b>	(2006.01)		
<b>A61P 31/00</b>	(2006.01)		
<b>A61P 35/00</b>	(2006.01)		
<b>A61P 37/06</b>	(2006.01)		
<b>A61P 37/08</b>	(2006.01)		
<b>C07K 14/54</b>	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.03.2014 PCT/JP2014/057919**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **25.09.2014 WO14148638**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.03.2014 E 14767791 (8)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.05.2018 EP 2977454**

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

30 Prioridad:

**22.03.2013 JP 2013060817**

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

**20.09.2018**

73 Titular/es:

**THE UNIVERSITY OF TOKYO (50.0%)**  
**3-1, Hongo 7-chome**  
**Bunkyo-ku, Tokyo 113-8654, JP y**  
**ZENYAKU KOGYO KABUSHIKIKAISHA (50.0%)**

72 Inventor/es:

**ISHIGURO, AKIRA;**  
**NAKAMURA, YOSHIKAZU;**  
**HARUTA, KAZUHIKO y**  
**OTAKI, NATSUKI**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

ES 2 682 356 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Aptámero para IL-17 y uso del mismo

- 5 En el presente documento se proporcionan un aptámero contra interleuquina (IL-17), un método de utilizar el mismo, y similar.

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

15 Como proteínas de la familia de IL-17, se conocen seis tipos de proteínas: IL-17A, B, C, D, E y F. En general, IL-17 se refiere a IL-17A. IL-17E también se denomina IL-25. La homología de secuencia de aminoácidos de IL-17 humana respecto a IL-17B, C, D, E y F humana es del 25, 28, 22, 27 y 44%, respectivamente, siendo IL-17F la de mayor homología. IL-17 humana tiene una homología del 63% respecto a IL-17 de ratón. Como receptores de la misma, se conocen IL-17RA, IL-17RB, IL-17RC, IL-17RD e IL-17RE. IL-17 e IL-17F forman un homodímero o heterodímero y se unen a IL-17RA e IL-17RC. La unión de IL-17 e IL-17RA es débil a un valor de Kd de aproximadamente  $10^{-7}$ , y la implicación de IL-17RC puede ser importante.

25 Las células Th17 son células T CD4<sup>+</sup> que producen IL-17. Cuando se estimulan células Th17 con IL-23 in vitro, se induce la producción de IL-17. Mientras tanto, TGF- $\beta$  e IL-6 desempeñan un papel importante en la inducción de la diferenciación de las células Th17. TGF- $\beta$  e IL-6 actúan sobre células T indiferenciadas para inducir la expresión de ROR $\gamma$ t (factor de transcripción). Puesto que una deficiencia en ROR $\gamma$ t previene que las células Th17 se diferencien, y también debido a que las células T indiferenciadas pueden, por el contrario, diferenciarse a células productoras de IL-17 por expresión forzada de ROR $\gamma$ t, se piensa que este factor de transcripción es importante para la diferenciación de células Th17. Aunque la activación de STAT3 por IL-6 es importante para la inducción de la expresión de ROR $\gamma$ t, la activación de STAT5 por IL-2, por el contrario, suprime la expresión. IL-2 es necesaria para la diferenciación de células T reguladoras; ratones deficientes en IL-2 muestran autoinmunidad grave; se piensa que esto es debido a una disminución en células T reguladoras junto con sobrediferenciación de células Th17. Cuando se estimulan células T indiferenciadas con TGF- $\beta$  solo in vitro, se inducen no células Th17, sino T reguladoras. El IFN- $\gamma$  producido por células Th1, IL-4 producida por células Th2, y similares actúan supresoramente sobre la diferenciación de células Th17.

40 Cuando IL-17 se une a un receptor de IL-17, se activan la ruta de NF- $\kappa$ B, la ruta de MAP quinasa, y la ruta de C/EBP, a través de Act-1 y TRAF6, lo que produce la inducción de citoquinas inflamatorias y quimioquinas. Por ejemplo, IL-17 actúa sobre macrófagos para inducir la expresión de IL-1, TNF y similares. Además, se sabe que IL-17 actúa también sobre células de tejido conjuntivo y células de tejido epitelial tal como fibroblastos y células endoteliales, y sobre células del sistema inmunitario tal como progenitores de células dendríticas, para inducir la expresión de varios receptores y citoquinas tal como IL-6 e IL-1.

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

50 Se ha encontrado que IL-17 está profundamente asociada con enfermedades inflamatorias, enfermedades autoinmunitarias, y similares. Se sabe que la expresión de IL-17 está elevada en pacientes con artritis reumatoide, degeneración macular senil, psoriasis, lupus eritematoso sistémico, enfermedad de Behçet, rechazo a injertos, síndrome nefrítico, enfermedad intestinal inflamatoria, asma, esclerosis múltiple, enfermedad periodontal y similares. En ratones deficientes en IL-17, se ha descrito que la artritis inducida por colágeno (CIA), que es un modelo de artritis reumatoide; encefalomielitis autoinmunitaria experimental (EAE), que es un modelo de esclerosis múltiple; reacciones de hipersensibilidad de tipo contacto por DNFB o TNCB; reacciones de hipersensibilidad de tipo retrasado por BSA metilada; reacciones hipersensibles de las vías respiratorias por inducción de OVA, y similares están marcadamente suprimidas.

60 IL-17 también se asocia con cánceres. Se ha descrito que el trasplante subcutáneo de células de cáncer de pulmón no microcítico a ratones SCID fomenta la proliferación de células cancerosas en ratones que tienen IL-17 muy expresada en los mismos. También se ha descrito que IL-17 también está asociada con cáncer cervical y cáncer ovárico.

65 IL-17 está asociada con enfermedades infecciosas. Ratones genomanipulados deficientes para el receptor de IL-17 son muy susceptibles a infección por *Klebsiella pneumoniae*, infección por *Candida albicans*, infección por *Toxoplasma gondii* y similares. La producción de IL-17 está inducida por lipopolisacáridos (LPS) y componentes del cuerpo celular bacteriano tal como de *Borrelia burgdorferi* y *Klebsiella pneumoniae*. Se piensa que estos componentes fomentan la producción de IL-17 actuando sobre células presentadoras de antígeno para inducir IL-23.

En ratones genomanipulados deficientes en IL-17R, después de infección por *Klebsiella pneumoniae*, en los sitios infectados en el pulmón, la producción de CXCL1, CXCL2, G-CSF y similares, que desempeñan un papel importante en la migración y funciones de neutrófilos, se reduce y la migración de neutrófilos se suprime.

5 En años recientes, las aplicaciones de aptámeros de ARN para fármacos terapéuticos, reactivos diagnósticos, y reactivos de prueba, han estado atrayendo atención; algunos aptámeros de ARN ya han estado en fase de estudio clínico o en uso práctico. En diciembre de 2004, el primer fármaco de aptámero de ARN del mundo, Macugen, se aprobó como un fármaco terapéutico para degeneración macular senil en los EE UU. Un aptámero de ARN se refiere a un ARN que se une específicamente a una molécula diana tal como una proteína, y se puede preparar usando el método SELEX (Evolución Sistemática de Ligandos por Enriquecimiento Exponencial) (cf. documentos de patente 1, 2 y 3). En el método SELEX, un ARN que se une específicamente a una molécula diana se selecciona de un conjunto de ARN con aproximadamente  $10^{14}$  secuencias de nucleótidos diferentes. El ARN usado tiene una secuencia aleatoria de aproximadamente 40 residuos, que está flanqueada por secuencias cebadoras. Este conjunto de ARN se deja mezclar con una molécula diana, y solo el ARN que se ha unido a la molécula diana se recoge usando un filtro y similar. El ARN recogido se amplifica por RT-PCR, y este se usa como un molde para la siguiente ronda. Repitiendo esta operación aproximadamente 10 veces, se puede obtener un aptámero de ARN que se une específicamente a la molécula diana.

20 Los fármacos aptámeros, como los fármacos de anticuerpos, pueden tener como objetivo factores extracelulares. Con referencia a muchos artículos científicos y otros materiales de referencia en el dominio público, hay una posibilidad de que los fármacos aptámeros superen a los fármacos de anticuerpos en algunos aspectos. Por ejemplo, los aptámeros con frecuencia muestran mayor fuerza de unión y mayor especificidad que los anticuerpos. Es poco probable que los aptámeros experimenten eliminación inmunitaria, y reacciones adversas que son características de anticuerpos y resultan de citotoxicidad celular mediada por anticuerpos (ADCC) y citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), no se producen con el uso de aptámeros. Desde el aspecto de la administración, puesto que los aptámeros son aproximadamente 1/10 de anticuerpo en tamaño, la administración de un fármaco al sitio objeto es más fácil. Puesto que los aptámeros se producen por síntesis química, se puede hacer fácilmente varias modificaciones, y la reducción de costes mediante producción a gran escala es posible. Mientras tanto, las semividas en sangre de aptámeros en general son más cortas que las de los anticuerpos; sin embargo, esta propiedad es algunas veces ventajosa en vista de la toxicidad. Estos hechos llevan a la conclusión de que incluso cuando la misma molécula es el objetivo, los fármacos aptámeros potencialmente sobrepasan a los fármacos de anticuerpo.

35 El documento de patente 4 y la correspondiente solicitud de patente europea (documento de patente 5) describen un aptámero obtenido por el método SELEX anteriormente mencionado, que se une a IL-17 para inhibir la unión de IL-17 y el receptor de IL-17.

[Lista de documentos]

40 [Documentos de patente]

Documento de patente 1: WO91/19813

Documento de patente 2: WO94/08050

Documento de patente 3: WO95/07364

45 Documento de patente 4: WO2010/008001

Documento de patente 5: EP 2 316 935 A1.

50 La presente divulgación se dirige a la provisión de un aptámero contra IL-17 y un método para utilizar el mismo, y similar. En particular, la presente divulgación se dirige a proporcionar un aptámero con mayor calidad que sea adecuado para su uso como un producto farmacéutico.

Los presentes inventores han realizado estudios intensos en un intento para resolver los problemas anteriormente mencionados y han producido con éxito un aptámero anti-IL-17 que tiene una calidad extremadamente alta y una actividad inhibitora de unión marcadamente alta contra IL-17 y el receptor de IL-17 comparado con aptámeros anti-IL-17 convencionalmente conocidos, y capaz de inhibir la actividad fisiológica de IL-17, que produjo la compleción de la presente invención.

Según esto, la presente invención es como sigue:

60 [1] un aptámero que comprende una secuencia representada por la siguiente fórmula (Ia), que se une a IL-17 para inhibir la unión de IL-17 y el receptor de IL-17:

$$g(M)g(M)g(M)u(M)a'(M)g'(X_1)c(M)c(M)g'g(M)a'(X_4)g(X_5)g(M)a(M)g(X_5)u'(F)c(X_7)a'(X_2)g(X_6)u'(F)r(X_3)a'(X_3)u(M)c(M)g(M)g(M)u'(X_7)a'(M)c'(M)c'(M)c'(M)$$

65 en donde

a, g, c y u son cada uno un ARN en donde la base es adenina, guanina, citosina y uracilo, respectivamente, r es un ARN en donde la base es adenina o guanina,

a', g' y c' son cada uno un ARN o ADN en donde la base es adenina, guanina y citosina, respectivamente,

5 u' es un ARN en donde la base es uracilo, un ADN en donde la base es uracilo o un ADN en donde la base es timina,

los paréntesis en un nucleótido indican modificación del nucleótido,

(M) indica que, cuando el nucleótido es un ARN, un grupo hidroxilo en la posición 2' de la ribosa en el mismo está sustituido por un grupo O-metilo,

10 (F) indica que, cuando el nucleótido es un ARN, un grupo hidroxilo en la posición 2' de la ribosa en el mismo está sustituido por un átomo de flúor,

(X<sub>1</sub>) indica que el nucleótido está sin modificar o fosforotioado, o cuando el nucleótido es un ARN, un grupo hidroxilo en la posición 2' de la ribosa en el mismo está sustituido por un átomo de flúor,

15 (X<sub>2</sub>) indica que el nucleótido está sin modificar, o cuando el nucleótido es un ARN, un grupo hidroxilo en la posición 2' de la ribosa en el mismo está sustituido por un átomo de flúor,

(X<sub>3</sub>) indica que el nucleótido está sin modificar, o cuando el nucleótido es un ARN, un grupo hidroxilo en la posición 2' de la ribosa en el mismo está sustituido por un grupo O-metilo,

(X<sub>4</sub>) indica que el nucleótido está sin modificar, o cuando el nucleótido es un ARN, un grupo hidroxilo en la posición 2' de la ribosa en el mismo está sustituido por un átomo de flúor o un grupo O-metilo,

20 (X<sub>5</sub>) indica que el nucleótido está sin modificar o fosforotioado,

(X<sub>6</sub>) indica que el nucleótido está sin modificar o fosforotioado, o cuando el nucleótido es un ARN, un grupo hidroxilo en la posición 2' de la ribosa en el mismo está sustituido por un grupo O-metilo, y

(X<sub>7</sub>) indica que cuando el nucleótido es un ARN, un grupo hidroxilo en la posición 2' de la ribosa en el mismo está sustituido por un átomo de flúor o un grupo O-metilo;

25 [2] el aptámero del anteriormente mencionado [1], que comprende una secuencia representada por la siguiente fórmula (Ia')

30  $g(M)g(M)g(M)u(M)a'(M)g(X_5)c(M)c(M)Gg(M)a(X_4)gg(M)a(M)g(X_5)u'(F)c(X_7)a(X_2)g(X_5)u'(F)r(X_3)a(X_3)u(M)c(M)g(M)g(M)u(X_7)a(M)c'(M)c'(M)c'(M)$

en donde a, g, c, u y r, a', c' y u', así como (M), (F) y (X<sub>2</sub>)-(X<sub>5</sub>) y (X<sub>7</sub>) son como se han definido para la fórmula (Ia), y G es un ADN en donde la base es guanina;

35 [3] el aptámero del anteriormente mencionado [1], que comprende una secuencia representada por la siguiente fórmula (I):

40  $g(M)g(M)g(M)u(M)a'(M)g'(X_1)c(M)c(M)g'g(M)a'(X_2)gg(M)a(M)gu'(F)c(F)a'(X_2)gu'(F)a(X_3)a'(X_3)u(M)c(M)g(M)g(M)u'(F)a'(M)c'(M)c'(M)c'(M)$

en donde a, g, c, u, a', g', c' y u', así como (M), (F) y (X<sub>1</sub>)-(X<sub>3</sub>) son como se han definido para la fórmula (Ia);

[4] el aptámero del anteriormente mencionado [1], que comprende una secuencia representada por la siguiente fórmula (Ia'')

45  $g(M)g(M)g(M)u(M)a'(M)g(X_5)c(M)c(M)Gg(M)a(X_7)g(X_5)g(M)a(M)g(X_5)u'(F)c(X_7)a(F)g(X_6)u'(F)r(X_3)a(X_3)u(M)c(M)g(M)g(M)u(X_7)a'(M)c'(M)c'(M)c'(M)$

50 en donde a, g, c, u y r, a', c' y u', así como (M), (F) y (X<sub>3</sub>) y (X<sub>5</sub>)-(X<sub>7</sub>) son como se han definido para la fórmula (Ia), y G es un ADN en donde la base es guanina;

[5] el aptámero del anteriormente mencionado [4], en donde, en la fórmula (Ia''), c'(M)c'(M)c'(M), en el lado 3'-terminal es c(M)c(M)c(M);

55 [6] el aptámero de cualquiera de los anteriormente mencionados [1]-[5], en donde un nucleótido en donde, cuando es un ARN, un grupo hidroxilo en la posición 2' de la ribosa en el mismo está opcionalmente sustituido por un grupo O-metilo y la base es guanina se añade al extremo 5' de la secuencia representada por la fórmula (Ia), (Ia'), (I) o (Ia''), y/o un nucleótido en donde la base es citosina se añade al extremo 3' de la misma;

60 [7] el aptámero del anteriormente mencionado [1], que comprende la secuencia de cualquiera de los aptámeros No. 52-94;

[8] el aptámero del anteriormente mencionado [3], que comprende la secuencia de cualquiera de los aptámeros No. 3-49;

65

[9] el aptámero de cualquiera de los anteriormente mencionados [1]-[8], que tiene una longitud de bases de no más de 70;

5 [10] un aptámero que comprende una secuencia representada por la siguiente fórmula (II), que se une a IL-17 para inhibir la unión de IL-17 y el receptor de IL-17:



en donde

10 a, g, c y u son cada uno un ARN en donde la base es adenina, guanina, citosina y uracilo, respectivamente,  
 g' y c' son cada uno un ARN o ADN en donde la base es guanina o citosina, respectivamente,  
 los paréntesis en un nucleótido indican modificación del nucleótido,  
 (F) indica que un grupo hidroxilo en la posición 2' de la ribosa en el nucleótido está sustituido por un átomo de flúor,  
 (S) indica que, cuando el nucleótido es ARN, está fosforotioado,  
 15 (x<sub>1</sub>) indica que el nucleótido está modificado con ácido nucleico bloqueado (ANB), o cuando el nucleótido es un ARN,  
 un grupo hidroxilo en la posición 2' de la ribosa en el mismo está sustituido por un grupo O-metilo,  
 (x<sub>2</sub>) indica que un nucleótido está sin modificar, o cuando el nucleótido es un ARN, un grupo hidroxilo en la posición  
 2' de la ribosa en el mismo está sustituido por un grupo O-metilo,  
 (x<sub>3</sub>) indica que un nucleótido está sin modificar, o modificado con ANB;

20 [11] el aptámero del anteriormente mencionado [10], que comprende la secuencia mostrada por el aptámero No. 1 o 2;

[12] el aptámero del anteriormente mencionado [10] o [11], que tiene una longitud de bases de no más de 70;

25 [13] el aptámero de cualquiera de los anteriormente mencionados [1]-[12], que está modificado con dT invertida o polietilenglicol (PEG);

30 [14] el aptámero del anteriormente mencionado [13], en donde la dT invertida o el polietilenglicol se une al extremo 5' y/o al extremo 3' del aptámero;

[15] un complejo que comprende el aptámero de cualquiera de [1]-[14] y una sustancia funcional;

35 [16] el complejo de [15], en donde la sustancia funcional es una sustancia de afinidad, una sustancia para marcar, una enzima, un vehículo de administración de fármacos, o un fármaco;

[17] un medicamento que comprende el aptámero de cualquiera de [1]-[14] o el complejo de [15] o [16];

40 [18] un medicamento para uso en el tratamiento o profilaxis de una enfermedad incluyendo enfermedad inflamatoria, enfermedad autoinmunitaria, cáncer, alergia, infección y similar, que comprende el aptámero de cualquiera de [1]-[14] o el complejo de [15] o [16];

[19] un reactivo diagnóstico que comprende el aptámero de cualquiera de [1]-[14] o el complejo de [15] o [16];

45 [20] una sonda de detección que comprende el aptámero de cualquiera de [1]-[14] o el complejo de [15] o [16];

[21] un soporte para la purificación de IL-17, que comprende el aptámero de cualquiera de [1]-[14] o el complejo de [15] o [16];

50 [22] un método de detectar IL-17, que comprende usar el aptámero de cualquiera de [1]-[14] o el complejo de [15] o [16]; y

[23] un método de purificar IL-17, que comprende usar el aptámero de cualquiera de [1]-[14] o el complejo de [15] o [16].

55 El aptámero o complejo de la presente divulgación puede ser útil como un medicamento o reactivo tal como un reactivo diagnóstico para una enfermedad incluyendo enfermedad inflamatoria, enfermedad autoinmunitaria, cáncer, alergia o infección, y similar. El aptámero o el complejo de la presente divulgación también puede ser útil en purificar y concentrar IL-17, marcaje de IL-17 y detectar y cuantificar IL-17.

60 **Breve descripción de los dibujos**

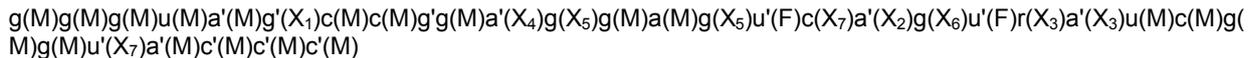
La figura 1 muestra la estructura de un aptámero pegilado modificado en el extremo 5' representativo cuando el aptámero de la presente invención se pegila a través de un enlazador, y la estructura de un aptámero pegilado modificado en el extremo 5' y en el extremo 3'.

La figura 2 muestra un efector supresor de un aptámero pegilado de la presente invención en el modelo de psoriasis inducida por IL-23 en ratón, en donde el eje horizontal muestra el grupo de administración de solución salina (grupo control negativo), grupo de administración de anticuerpo anti-IL-17 (grupo control positivo), y grupo de administración de aptámero pegilado (A: aptámero No. 8; B: aptámero No. 51 y aptámero No. 48), y el eje vertical muestra el espesor del pabellón auricular de ratón. En la figura, cada valor muestra la media  $\pm$  error estándar de la media (n = 4 o 5), y se analizó una diferencia estadísticamente significativa por análisis unidireccional de la varianza y el método de Dunnett (\*: P<0,05).

La figura 3 muestra un efecto supresor de artritis de un aptámero pegilado de la presente invención en el modelo de artritis inducida por glucosa-6-fosfato isomerasa en ratones. En la figura, el cuadrado abierto muestra el grupo de administración de solución salina (grupo control), y el círculo cerrado muestra el grupo de administración de aptámero pegilado (aptámero No. 8). En la figura, cada valor muestra la media  $\pm$  error estándar de la media (n = 10), y se analizó una diferencia estadísticamente significativa por el método de Wilcoxon-Mann-Whitney (\*: P<0,05, \*\*: P<0,01).

La figura 4 muestra un efecto supresor de artritis de un aptámero pegilado de la presente invención en el modelo de artritis inducida por colágeno en ratones. En la figura, el cuadrado abierto muestra el grupo de administración de solución salina (grupo control), el círculo cerrado muestra el grupo de administración de aptámero pegilado (A: aptámero No. 8; B: aptámero No. 64), y el rombo negro muestra el grupo de administración de un aptámero conocido (aptámero No. 51). En la figura, cada valor muestra la media  $\pm$  error estándar de la media (n = 9 o 10), y se analizó una diferencia estadísticamente significativa por el método de Wilcoxon-Mann-Whitney (\*: P<0,05, \*\*: P<0,01).

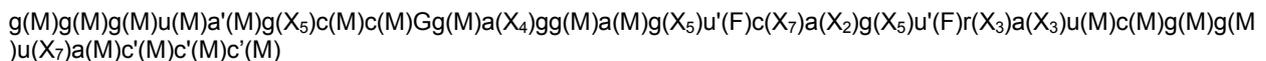
En la primera forma de realización, la presente invención proporciona un aptámero que comprende una secuencia representada por la siguiente fórmula (Ia), que se une a IL-17 para inhibir la unión de IL-17 y el receptor de IL-17:



en donde

- a, g, c y u son cada uno un ARN en donde la base es adenina, guanina, citosina y uracilo, respectivamente,
- r es un ARN en donde la base es adenina o guanina,
- a', g' y c' son cada uno un ARN o ADN en donde la base es adenina, guanina y citosina, respectivamente,
- u' es un ARN en donde la base es uracilo, un ADN en donde la base es uracilo o un ADN en donde la base es timina,
- los paréntesis en un nucleótido indican modificación del nucleótido,
- (M) indica que, cuando el nucleótido es un ARN, un grupo hidroxilo en la posición 2' de la ribosa en el mismo está sustituido por un grupo O-metilo,
- (F) indica que, cuando el nucleótido es un ARN, un grupo hidroxilo en la posición 2' de la ribosa en el mismo está sustituido por un átomo de flúor,
- (X<sub>1</sub>) indica que el nucleótido está sin modificar o fosforotioado, o cuando el nucleótido es un ARN, un grupo hidroxilo en la posición 2' de la ribosa en el mismo está sustituido por un átomo de flúor,
- (X<sub>2</sub>) indica que el nucleótido está sin modificar, o cuando el nucleótido es un ARN, un grupo hidroxilo en la posición 2' de la ribosa en el mismo está sustituido por un átomo de flúor,
- (X<sub>3</sub>) indica que el nucleótido está sin modificar, o cuando el nucleótido es un ARN, un grupo hidroxilo en la posición 2' de la ribosa en el mismo está sustituido por un grupo O-metilo,
- (X<sub>4</sub>) indica que el nucleótido está sin modificar, o cuando el nucleótido es un ARN, un grupo hidroxilo en la posición 2' de la ribosa en el mismo está sustituido por un átomo de flúor o un grupo O-metilo,
- (X<sub>5</sub>) indica que el nucleótido está sin modificar o fosforotioado,
- (X<sub>6</sub>) indica que el nucleótido está sin modificar o fosforotioado, o cuando el nucleótido es un ARN, un grupo hidroxilo en la posición 2' de la ribosa en el mismo está sustituido por un grupo O-metilo, y
- (X<sub>7</sub>) indica que cuando el nucleótido es un ARN, un grupo hidroxilo en la posición 2' de la ribosa en el mismo está sustituido por un átomo de flúor o un grupo O-metilo.

En una forma de realización preferible, la presente invención proporciona un aptámero que comprende una secuencia representada por la siguiente fórmula (Ia'), que se une a IL-17 para inhibir la unión de IL-17 y el receptor de IL-17:



en donde a, g, c, u y r, a', c' y u', así como (M), (F) y (X<sub>2</sub>)-(X<sub>5</sub>) y (X<sub>7</sub>) son como se han definido para la fórmula (Ia), y G es un ADN en donde la base es guanina.

En una forma de realización preferible, la presente invención proporciona un aptámero que comprende una secuencia representada por la siguiente fórmula (I), que se une a IL-17 para inhibir la unión de IL-17 y el receptor de IL-17:

5  $g(M)g(M)g(M)u(M)a'(M)g'(X_1)c(M)c(M)g'g(M)a'(X_2)gg(M)a(M)gu'(F)c(F)a'(X_2)gu'(F)a(X_3)a'(X_3)u(M)c(M)g(M)g(M)u'(F)a'(M)c'(M)c'(M)c'(M)$

en donde a, g, c, y u, a', g', c' y u', así como (M), (F) y (X<sub>1</sub>)-(X<sub>3</sub>) son como se han definido para la fórmula (Ia).

10 En una forma de realización preferible, además, la presente invención proporciona un aptámero que comprende una secuencia representada por la siguiente fórmula (Ia''), que se une a IL-17 para inhibir la unión de IL-17 y el receptor de IL-17:

15  $g(M)g(M)g(M)u(M)a'(M)g(X_5)c(M)c(M)Gg(M)a(X_7)g(X_5)g(M)a(M)g(X_5)u'(F)c(X_7)a(F)g(X_6)u'(F)r(X_3)a(X_3)u(M)c(M)g(M)g(M)u(X_7)a'(M)c'(M)c'(M)c'(M)$

en donde a, g, c, u y r, a', c' y u', así como (M), (F), (X<sub>3</sub>) y (X<sub>5</sub>)-(X<sub>7</sub>) son como se han definido para la fórmula (Ia), y G es un ADN en donde la base es guanina.

20 En una forma de realización preferible, además, la presente invención proporciona un aptámero que se une a IL-17 para inhibir la unión de IL-17 y el receptor de IL-17, en donde, en la fórmula (Ia''), c'(M)c'(M)c'(M) en el lado 3' terminal es c(M)c(M)c(M).

25 Un aptámero se refiere a una molécula de ácido nucleico que tiene una actividad de unión para una molécula diana particular. El aptámero puede inhibir la actividad de una molécula diana particular uniéndose a la molécula diana particular. El aptámero de la presente divulgación puede ser un ARN, un ADN, un ácido nucleico modificado o una mezcla de los mismos. El aptámero de la presente divulgación también puede estar en una forma lineal o cíclica.

30 IL-17 se refiere a una citoquina secretada por células Th17 y similares, y es, por ejemplo, una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada por el código de acceso AAH67505 o NP002181. IL-17 algunas veces se denomina IL-17A o CTLA-8. Además de ser producida en cuerpos animales, IL-17 como se usa en la presente divulgación se puede producir usando células de ratón y otros mamíferos, células de insecto, células de Escherichia coli y similares, y también se puede preparar por síntesis química. Cuando IL-17 se prepara por cultivo celular o síntesis química, se puede preparar fácilmente un mutante. Aquí, un mutante significa una secuencia en donde varios aminoácidos se han sustituido o una secuencia parcial de aminoácidos, y significa una proteína o péptido que tiene al menos una de las actividades esencialmente poseídas por IL-17. Cuando se sustituye un aminoácido, el aminoácido sustituyente puede ser un aminoácido natural, o puede ser un aminoácido no natural. Como se menciona en el presente documento, IL-17 incluye estos mutantes.

40 Un receptor de IL-17 significa una proteína de superficie celular a la que se une IL-17 y una proteína que media la señalización intracelular. Como miembros de la familia del receptor de IL-17, se conocen IL-17RA, IL-17RB, IL-17RC, IL-17RD e IL-17RE. Como se ha mencionado en el presente documento, el receptor de IL-17 puede ser una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos naturales, o puede ser un mutante de la misma. Aquí, un mutante significa una secuencia en donde varios aminoácidos se han sustituido o una secuencia parcial de aminoácidos, y significa una proteína o péptido que posee actividad de unión para IL-17. El aptámero proporcionado en el presente documento inhibe la unión de IL-17 y el receptor de IL-17.

50 Si el aptámero de la presente divulgación inhibe la unión de IL-17 y el receptor de IL-17 se puede evaluar, por ejemplo, mediante la siguiente prueba.

Para la medida se usa BIAcore2000 o T100 fabricado por BIAcore. Se inmoviliza proteína A (21181, PIERCE) en un chip sensor CM5, y una proteína en donde el receptor de IL-17 y la parte Fc de IgG están fusionadas (por ejemplo, quimera IL-17R recombinante humano-Fc (177-IR, R&D systems)) se inmoviliza sobre la misma. La cantidad que se va a inmovilizar es aproximadamente 20 (para 2000) o aproximadamente 1200RU. Como analito, se mezclan IL-17 (aproximadamente 100 o 150 nM) y un aptámero (aproximadamente 50 o 100 nM), se mantienen durante 15 min y la mezcla se inyecta en BIAcore2000. Se detecta la unión de IL-17 al receptor de IL-17.

60 Según se vuelve más bajo el valor, se juzga que el aptámero inhibe más fuertemente la unión de IL-17 y el receptor de IL-17.

En una forma de realización preferible, el aptámero proporcionado en el presente documento se une a IL-17 para inhibir la unión de IL-17 y el receptor de IL-17, por lo cual puede inhibir la actividad de señalización de IL-17 derivada de cualquier mamífero. Los ejemplos del mamífero incluyen primates (por ejemplo, seres humanos, monos), roedores (por ejemplo, ratones, ratas, cobayas), y animales de compañía, animales domésticos y animales de trabajo (por ejemplo, perros, gatos, caballos, ganado, cabras, ovejas, cerdos).

La inhibición de la actividad de señalización de IL-17 significa una capacidad inhibidora contra cualquier actividad de señalización que tenga IL-17. Por ejemplo, se sabe que IL-17 se une al receptor de IL-17, y activa la ruta de NF-κB y la ruta de MAP quinasa a través de TRAF6 y similar, y después se induce la producción de varias citoquinas y quimioquinas a través de tales rutas de transducción de señales. Por tanto, la actividad inhibidora de la señalización de IL-17 se refiere a una actividad que inhibe la producción de estas citoquinas, quimioquinas y similares, que están presentes al final de la ruta de transducción de señales de IL-17. Puesto que la expresión de estas citoquinas y quimioquinas induce la migración y activación de células inflamatorias, la actividad inhibidora de la señalización contra IL-17 también significa inhibición de las actividades de las mismas.

En el aptámero de la presente divulgación, una parte del nucleótido se modifica como se muestra en las fórmulas mencionadas anteriormente (Ia), (Ia'), (I) y (Ia'') para aumentar la propiedad de unión a IL-17, actividad inhibidora de unión contra IL-17 y el receptor de IL-17, y similar.

En la presente especificación, nucleótido que está sin modificar significa que un grupo hidroxilo en la posición 2' de la ribosa en un ribonucleótido, o hidrógeno en la posición 2' de la ribosa en un desoxirribonucleótido no está sustituido por otro elemento, y nucleótido que está modificado significa, por ejemplo, que un grupo hidroxilo en la posición 2' de la ribosa en un ribonucleótido está sustituido por un átomo de flúor o un grupo O-metilo, el nucleótido está fosforotioado, modificado con un ácido nucleico bloqueado (ANB), y similar. El "nucleótido está fosforotioado" significa que un grupo ácido fosfórico en un sitio de unión entre nucleótidos adyacentes está sulfurado, es decir, un enlace fosfodiéster se convierte a un enlace fosforotioato, y que está modificado con ANB significa que un átomo de oxígeno en la posición 2' de la ribosa y un átomo de carbono en la posición 4' del nucleótido están entrecruzados con metileno.

Se pueden realizar varias modificaciones mostradas en las fórmulas (Ia), (Ia'), (I) y (Ia'') según un método conocido por sí (por ejemplo, Sproat et al., (1991), Nucl. Acid. Res. 19, 733-738; Cotton et al., (1991), Nucl. Acid. Res. 19, 2629-2635; Hobbs et al., (1973), Biochemistry 12, 5138-5145 y similares).

La presente invención también proporciona un aptámero que se une a IL-17 para inhibir la unión de IL-17 y el receptor de IL-17, que comprende una secuencia en donde un nucleótido en donde, cuando es un ARN, un grupo hidroxilo en la posición 2' de la ribosa en el mismo está opcionalmente sustituido por un grupo O-metilo y la base es guanina se añade al extremo 5' de la secuencia representada por la fórmula (Ia), (Ia'), (I) o (Ia'') y/o un nucleótido en donde la base es citosina se añade al extremo 3' del mismo.

Preferiblemente, el aptámero de la presente invención puede ser un aptámero que comprende una secuencia seleccionada de los aptámeros No. 3-49 y 52-94 mostrados posteriormente. También se proporciona en el presente documento un conjugado de una pluralidad de tales aptámeros siempre que se una a IL-17 e inhiba la unión de IL-17 y el receptor de IL-17.

En el conjugado mencionado anteriormente de una pluralidad de tales aptámeros, la conjugación se puede lograr por unión en tándem. En la conjugación, se puede utilizar un enlazador. Como el enlazador, se pueden mencionar cadenas de nucleótidos (por ejemplo, de 1 a aproximadamente 20 nucleótidos) y cadenas no nucleotídicas (por ejemplo, enlazador  $-(CH_2)_n-$ , enlazador  $-(CH_2CH_2O)_n-$ , enlazador hexaetilenglicol, enlazador TEG, enlazador que contiene péptido, enlazador que contiene enlace -S-S-, enlazador que contiene enlace -CONH-, enlazador que contiene enlace -OPO<sub>3</sub>-). La pluralidad como se ha mencionado en los conjugados plurales descritos anteriormente no está particularmente limitada, siempre que sea dos o más, y la pluralidad puede ser, por ejemplo, 2, 3 o 4.

La longitud del aptámero de la presente divulgación no está particularmente limitada, y habitualmente puede ser no más de aproximadamente 200 nucleótidos. Cuando el número total de nucleótidos es menor, la síntesis química y producción en masa será más fácil, y hay una ventaja principal en términos de coste. También se considera que la modificación química es fácil, y la estabilidad en el cuerpo es alta. Por tanto, desde los aspectos de aplicación al uso de un producto farmacéutico, el aptámero de la presente invención más deseablemente tiene una longitud de bases más corta de 70 nucleótidos, preferiblemente no más de aproximadamente 50 nucleótidos, más preferiblemente no más de aproximadamente 40 nucleótidos (por ejemplo, no más de 40 nucleótidos, no más de 39 nucleótidos, no más de 38 nucleótidos, no más de 37 nucleótidos, no más de 36 nucleótidos), lo más preferiblemente no más de aproximadamente 35 nucleótidos (por ejemplo, no más de 35 nucleótidos, no más de 34 nucleótidos, no más de 33 nucleótidos).

En otra forma de realización, además, la presente invención proporciona un aptámero que comprende una secuencia representada por la siguiente fórmula (II), que se une a IL-17 para inhibir la unión de IL-17 y el receptor de IL-17:



en donde

a, g, c y u son cada uno un ARN en donde la base es adenina, guanina, citosina y uracilo, respectivamente, g' y c' son cada uno un ARN o ADN en donde la base es guanina o citosina, respectivamente,

los paréntesis en un nucleótido indican modificación del nucleótido,

(F) indica que un grupo hidroxilo en la posición 2' de la ribosa en el nucleótido está sustituido por un átomo de flúor,

(S) indica que, cuando el nucleótido es ARN, está fosforotioado,

5 (x<sub>1</sub>) indica que el nucleótido está modificado con ANB, o cuando el nucleótido es un ARN, un grupo hidroxilo en la posición 2' de la ribosa en el mismo está sustituido por un grupo O-metilo,

(x<sub>2</sub>) indica que un nucleótido está sin modificar, o cuando el nucleótido es un ARN, un grupo hidroxilo en la posición 2' de la ribosa en el mismo está sustituido por un grupo O-metilo, y

(x<sub>3</sub>) indica que un nucleótido está sin modificar, o modificado con ANB.

10 Además, en un aptámero que contiene una secuencia representada por la anteriormente mencionada fórmula (II), el nucleótido está parcialmente modificado como en el aptámero que contiene una secuencia representada por la anteriormente mencionada fórmula (Ia), (Ia'), (I) o (Ia''). La modificación mostrada en la fórmula (II) se puede realizar según un método conocido por sí como se ha mencionado anteriormente.

15 Preferiblemente, el aptámero de la presente invención puede ser un aptámero que contiene una secuencia seleccionada de los aptámeros No. 1 o 2 mostrados posteriormente. También se proporciona en el presente documento un conjugado de una pluralidad de tales aptámeros siempre que se una a IL-17 e inhiba la unión de IL-17 y el receptor de IL-17.

20 En el conjugado mencionado anteriormente de una pluralidad de tales aptámeros, la conjugación se puede lograr por unión en tándem. En la conjugación, se puede utilizar un enlazador. Como el enlazador, se pueden mencionar cadenas de nucleótidos (por ejemplo, de 1 a aproximadamente 20 nucleótidos) y cadenas no nucleotídicas (por ejemplo, enlazador  $-(CH_2)_n-$ , enlazador  $-(CH_2CH_2O)_n-$ , enlazador hexaetilenglicol, enlazador TEG, enlazador que contiene péptido, enlazador que contiene enlace -S-S-, enlazador que contiene enlace -CONH-, enlazador que contiene enlace -OPO<sub>3</sub>-). La pluralidad como se ha mencionado en los conjugados plurales descritos anteriormente no está particularmente limitada, siempre que sea dos o más, y la pluralidad puede ser, por ejemplo, 2, 3 o 4.

25 En el aptámero de la presente divulgación, la base del ácido nucleico se puede alterar adicionalmente (por ejemplo, sustitución química) para aumentar la propiedad de unión a IL-17, actividad inhibidora de unión contra IL-17 y el receptor de IL-17, estabilidad, y similares. Tal alteración incluye la del extremo 3' y el extremo 5' tal como formación de caperuza.

30 Se puede realizar adicionalmente una alteración añadiendo a un extremo un polietilenglicol, aminoácido, péptido, dT invertida, ácido nucleico, nucleósidos, polinucleótido, miristoilo, oleilo litocólico, docosanoilo, lauroilo, estearoilo, palmitoilo, oleoilo, linoleoilo, otros lípidos, esteroides, colesterol, cafeína, vitaminas, pigmentos, sustancias fluorescentes, agente anticáncer, toxina, enzimas, sustancia radioactiva, biotina y similar. Para tales alteraciones, véase, por ejemplo, las patentes en EE UU 5.660.985 y 5.756.703.

35 En particular, cuando se realiza una alteración por adición terminal de PEG, el peso molecular del PEG no está particularmente limitado, y es preferiblemente 1000-100000, más preferiblemente 20000-9000. El PEG puede ser lineal o ramificado en dos o más cadenas (PEG multibrazo). En relación a la adición terminal de PEG, se puede añadir solo a uno del extremo 3' y el extremo 5', o a ambos del extremo 3' y el extremo 5'.

40 Tal PEG no está particularmente limitado, y los expertos en la materia puede seleccionar y usar apropiadamente PEG comercialmente disponible o conocido (por ejemplo, [http://www.peg-drug.com/peg\\_product/branched.html](http://www.peg-drug.com/peg_product/branched.html)). Ejemplos preferibles específicos de PEG que se va a aplicar al aptámero proporcionado en el presente documento incluyen PEG de tipo CS y PEG de tipo GS (SUNBRIGHT ME-200GS fabricado por NOF CORPORATION) que tiene un peso molecular de 20000, PEG de tipo GS con dos ramificaciones que tiene un peso molecular de 40000 (SUNBRIGHT GL2-400GS2 fabricado por NOF CORPORATION), PEG de tipo TS con dos ramificaciones que tiene un peso molecular de 40000 (SUNBRIGHT GL2-400TS fabricado por NOF CORPORATION), PEG de tipo TS con 4 ramificaciones que tiene un peso molecular de 40000 (SUNBRIGHT GL4-400TS fabricado por NOF CORPORATION), PEG de tipo TS con 2 ramificaciones que tiene un peso molecular de 80000 (SUNBRIGHT GL2-800TS fabricado por NOF CORPORATION), PEG de tipo TS con 4 ramificaciones que tiene un peso molecular de 80000 (SUNBRIGHT GL4-800TS fabricado por NOF CORPORATION) y similares.

45 En este caso, en el aptámero proporcionado en el presente documento, el PEG se puede añadir directamente al extremo. Es más preferible que un enlazador que tiene un grupo que se puede unir a PEG y similar se deba añadir al extremo del mismo, y el PEG se debe añadir al aptámero proporcionado en el presente documento a través del enlazador.

50 El enlazador para PEG y el aptámero proporcionado en el presente documento no está particularmente limitado, y el número de cadena de carbono, grupo funcional y similar se puede seleccionar apropiadamente según el sitio de unión, el tipo de PEG y similar. Los ejemplos de tal enlazador incluyen un enlazador que tiene un grupo amino. Específicamente, cuando se añade al extremo 5', se pueden mencionar enlazador ssH (SAFC) o DMS(O)MT-AMINO-MODIFIER (GLEN RESEARCH), y cuando se añade al extremo 3', se puede mencionar TFA amino C-6 Icaa CPG (ChemGenes) y similar. Cuando este enlazador se selecciona, por ejemplo, se añade un grupo activo de N-

hidroxisuccinimida al PEG, y se hace reaccionar con el grupo amino en el lado del enlazador, mediante lo cual el aptámero proporcionado en el presente documento se puede unir a PEG a través del enlazador.

5 Como PEG y enlazador, se pueden usar preferiblemente productos comercialmente disponibles. Las condiciones de reacción y similar respecto a la unión de PEG, un enlazador y el aptámero proporcionado en el presente documento las pueden determinar apropiadamente los expertos en la materia.

10 El aptámero proporcionado en el presente documento se puede sintetizar químicamente como se divulga en el presente documento y por un método conocido por sí en la técnica. Un aptámero se une a la molécula diana en una amplia variedad de modos de unión, tal como enlaces iónicos basados en la carga negativa del grupo fosfato, enlaces hidrofóbicos y enlaces de hidrógeno basados en la ribosa, y enlaces de hidrógeno e interacción de apilamiento basado en bases de ácidos nucleicos. En particular, los enlaces iónicos basados en la carga negativa del grupo fosfato, que están presentes en el mismo número que el número de nucleótidos constituyentes, son fuertes y se unen a lisina y arginina que están presentes en la superficie de la carga positiva de la proteína. Por esta razón, las bases de ácido nucleico no implicadas en la unión directa a la molécula diana se pueden sustituir. En particular, puesto que la región de la estructura de tallo ya ha formado pares de bases y se enfrenta al interior de la estructura de doble hélice, es poco probable que las bases del ácido nucleico se unan directamente a la molécula diana. Por tanto, incluso cuando un par de bases se sustituye con otro par de bases, la actividad del aptámero con frecuencia no disminuye. En estructuras en donde no se forman pares de bases, tal como estructuras en bucle, siempre que la base del ácido nucleico no esté implicada en la unión directa a la molécula diana, la sustitución de la base es posible. Respecto a las modificaciones de la posición 2' de la ribosa, el grupo funcional en la posición 2' de la ribosa con poca frecuencia interacciona directamente con la molécula diana, pero en muchos casos, no tiene relevancia, y se puede sustituir por otra molécula modificada. Por tanto, un aptámero, a menos que el grupo funcional implicado en la unión directa a la molécula diana se sustituya o suprima, con frecuencia retiene la actividad del mismo. También es importante que la estructura tridimensional global no cambie mucho.

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

30 Los aptámeros obtenidos por SELEX son ácidos nucleicos que muestran alta afinidad por la molécula diana, pero esto no significa unión a un sitio bioactivo de la molécula diana. Por tanto, los aptámeros obtenidos por SELEX no actúan necesariamente sobre la función de la sustancia diana. IL-17 es una proteína básica, y se piensa que es probable permitir que los ácidos nucleicos se unan a misma de forma no específica. Un aptámero que no se une a un sitio activo no afecta la actividad de la sustancia diana. De hecho, el ARN usado para control no inhibió la unión de IL-17 y el receptor de IL-17.

40 El aptámero activo así seleccionado se puede someter a optimización por SELEX para alcanzar alta función. Para la optimización por SELEX, se prepara un molde en donde un aptámero con una secuencia determinada se aleatoriza parcialmente o un molde dopado con aproximadamente del 10 al 30% de secuencias aleatorias, y se realiza SELEX otra vez.

50 Un aptámero obtenido por SELEX tiene una longitud de aproximadamente 70 nucleótidos, y esto no es fácil de preparar como un medicamento como está. Por tanto, es necesario repetir esfuerzos de ensayo y error para acotar el aptámero a una longitud de aproximadamente 50 nucleótidos o menos que permita la síntesis química fácil.

55 Dependiendo del diseño de los cebadores para un aptámero obtenido por SELEX, la facilidad de la posterior operación de minimización cambia. A menos que se diseñe un cebador apropiado, el posterior desarrollo será imposible incluso si un aptámero con actividad se selecciona por SELEX. En la presente divulgación, se puede obtener un aptámero capaz de mantener la actividad incluso con 31 nucleótidos (aptámeros No. 1-4, 6-15, 19-49 y 52-94) o 33 nucleótidos (aptámeros No. 5 y 16-18).

60 Los aptámeros son fácilmente modificables porque permiten la síntesis química. Para los aptámeros, al predecir la estructura secundaria usando el programa MFOLD, o al predecir la conformación por análisis de rayos X o análisis de RMN, es posible predecir a algún nivel qué nucleótido se puede sustituir o suprimir, y dónde insertar un nuevo nucleótido. Un aptámero predicho con la nueva secuencia se puede sintetizar químicamente con facilidad, y se puede determinar si el aptámero retiene o no la actividad usando un sistema de ensayo existente.

65 Cuando una región importante para la unión del aptámero obtenido con la molécula diana se identifica por esfuerzos repetidos de ensayo y error como se ha descrito anteriormente, la actividad permanece sin cambios en muchos

casos incluso cuando se añade una nueva secuencia a ambos extremos de la secuencia. La longitud de la nueva secuencia no está particularmente limitada.

Las modificaciones, como secuencias, dan una amplia gama de diseño o alteraciones.

Como se ha manifestado anteriormente, los aptámeros permiten una amplia gama de diseño o alteraciones. La presente divulgación también proporciona un método de producción de aptámero que permite una amplia gama de diseño o alteración de un aptámero que comprende una secuencia especificada (por ejemplo, una secuencia que corresponde a una parte seleccionada de entre regiones tallo, regiones bucle internas, regiones bucle en horquilla y regiones monocatenarias: de aquí en adelante, abreviado como secuencia fija según se requiera).

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

Tabla 1

Secuencia cebadora (i)	- (N) <sup>a</sup> -secuencia fija- (N) <sup>b</sup>	Secuencia cebadora (ii)
	-	

en donde (N)<sup>a</sup> representa una cadena de nucleótidos que consiste en "a" unidades de N; (N)<sup>b</sup> representa una cadena de nucleótidos que consiste en "b" unidades de N; cada una de las unidades de N, ya sean idénticas o diferentes, es un nucleótido seleccionado del grupo que consiste en A, G, C, U y T (preferiblemente A, G, C y U). Cada uno de "a" y "b", sean idénticos o diferentes, puede ser cualquier número, y puede ser, por ejemplo, de 1 hasta aproximadamente 100, preferiblemente de 1 hasta aproximadamente 50, más preferiblemente de 1 hasta aproximadamente 30, aún más preferiblemente de 1 hasta aproximadamente 20 o de 1 hasta aproximadamente 10, o tipos plurales de moléculas de ácido nucleico (por ejemplo, genoteca de moléculas de ácido nucleico diferente en el número de a, b, etc.), y pares de cebadores correspondientes a las secuencias de cebadores (i) y (ii), respectivamente.

La presente invención también proporciona un complejo que comprende el aptámero de la presente invención y una sustancia funcional unida al mismo. La unión entre el aptámero y la sustancia funcional en el complejo puede ser un enlace covalente o un enlace no covalente. El complejo de la presente divulgación puede ser uno en donde el aptámero de la presente divulgación y una o más (por ejemplo, 2 o 3) de sustancias funcionales del mismo tipo o tipos diferentes están unidos. La sustancia funcional no está particularmente limitada, siempre que nuevamente añada una cierta función a un aptámero de la presente divulgación, o sea capaz de cambiar (por ejemplo, mejorar) una cierta característica que un aptámero de la presente divulgación pueda poseer. Como ejemplos de la sustancia funcional se pueden mencionar proteínas, péptidos, aminoácidos, lípidos, azúcares, monosacáridos, polinucleótidos, y nucleótidos. Como ejemplos de la sustancia funcional, se pueden mencionar sustancias de afinidad (por ejemplo, biotina, estreptavidina, polinucleótidos que poseen afinidad para una secuencia complementaria diana, anticuerpos, glutatión Sepharosa, histidina), sustancias para marcaje (por ejemplo, sustancias fluorescentes, sustancias luminiscentes, radioisótopos), enzimas (por ejemplo, peroxidasa de rábano, fosfatasa alcalina), vehículos de administración de fármacos (por ejemplo, liposoma, microesferas, péptidos, polietilenglicoles), fármacos (por ejemplo, los usados en terapia de misiles tal como caliqueamicina y duocarmicina; análogos de mostaza de nitrógeno tal como ciclofosfamida, melfalán, ifosfamida o trofosfamida; etileniminas tal como tiotepa; nitrosoureas tal como carmustina; agentes alquilantes tal como temozolomida o dacarbacina; antagonistas metabólicos de tipo folato tal como metotrexato o raltitrexed; análogos de purina tal como tioguanina, cladribina, o fludarabina; análogos de pirimidina tal como fluorouracilo, tegafur o gemcitabina; alcaloides de la vinca tal como vinblastina, vincristina o vinorelbina y análogos de los mismos; derivados de podofilotoxina tal como etopósido, taxanos, docetaxel o paclitaxel; antraciclinas tal como doxorubicina, epirubicina, idarrubicina y mitoxantrona, y análogos de las mismas; otros antibióticos citotóxicos tal como bleomicina y mitomicina; compuestos de platino tal como cisplatino, carboplatino y oxaliplatino; pentostatina, miltefosina, estramustina, topotecano, irinotecano y bicalutamida), y toxinas (por ejemplo, toxina ricina, liatoxina y toxina Vero). Estas moléculas funcionales por último se eliminan en algunos casos. Además, las moléculas pueden ser péptidos que son reconocidos y cortados por enzimas tal como trombina, metaloproteinas de matriz (MMP), y factor X, y pueden ser polinucleótidos que pueden ser cortados por nucleasas o enzimas de restricción.

El aptámero o complejo de la presente divulgación se puede usar como, por ejemplo, un medicamento, fármaco diagnóstico, fármaco de examen, o reactivo. El mismo es particularmente útil como un medicamento, fármaco diagnóstico, fármaco de examen, o reactivo para enfermedades de inflamación, enfermedades autoinmunitarias y similares.

Los ejemplos de enfermedades inflamatorias y enfermedades autoinmunitarias y similares incluyen esclerosis múltiple (EM), lupus eritematoso sistémico (LES), espondilitis anquilosante (EA), síndrome de Sjögren, polimiositis (PM), dermatomiositis (DM), artritis reumatoide (AR), artrosis, enfermedad intestinal inflamatoria (enfermedad de Crohn y similar), esclerosis sistémica (PSS), esclerodermia, periarteritis nodosa (PN), enfermedad de la glándula tiroidea (enfermedad de Graves, tiroiditis de Hashimoto, y similares), síndrome de Guillain-Barré, cirrosis biliar

primaria (CBP), púrpura trombocitopénica idiopática, anemia hemolítica autoinmunitaria, miastenia grave (MG), esclerosis lateral amiotrófica (ELA), diabetes mellitus de tipo I, psoriasis en placa, psoriasis pustular, asma, anomalías funcionales de neutrófilos, neumonía eosinofílica, fibrosis pulmonar idiopática, neumonía hipersensible, cáncer (por ejemplo, cáncer esofágico, cáncer de tiroides, cáncer de vejiga urinaria, cáncer colorrectal, cáncer gástrico, cáncer pancreático, cáncer de pecho, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, cáncer de pulmón no microcítico, cáncer de mama, neuroblastoma, glioblastoma, cáncer uterino, cáncer cervical, cáncer ovárico, tumor de Wilms, cáncer de próstata, osteosarcoma), enfermedad de trasplante (por ejemplo, rechazos a injertos, enfermedad del injerto contra el huésped), alergia (por ejemplo, rinitis alérgica, dermatitis atópica, hipersensibilidad alimentaria, urticaria, neumonitis de hipersensibilidad), enfermedades asociadas a ANCA, distrofia muscular de Duchenne, enfisema, edema pulmonar, tuberculosis pulmonar, proteinosis alveolar pulmonar, linfangioleiomiomatosis pulmonar (LAM), neumotórax, pleuritis, adhesión posoperatoria, endometriosis, periodontitis adulta, bronquitis, enfermedades pulmonares obstructivas crónicas (EPOC), infecciones, degeneración macular senil, retinopatía, glaucoma, cataratas, uveítis, enfermedad de Behcet, hepatitis, cirrosis, insuficiencia hepática, infarto renal, nefritis, insuficiencia renal, cistitis, infarto cerebral, hemorragia cerebral, hemorragia intracraneal, hemorragia subaracnoide, encefalopatía hipersensible, embolia cerebral, ataque isquémico cerebral transitorio, osteomielitis, artritis piogénica, osteoporosis, hernia de disco intervertebral, gota y similares.

El aptámero o complejo de la presente divulgación también se puede usar como un vehículo de administración de fármacos, una sonda para imagenología in vivo, una sonda para la determinación de concentraciones en sangre de IL-17, una sonda para tinción histológica, una sonda para ELISA, y un ligando para la separación y purificación de IL-17.

Se sabe que IL-17 actúa en varias células como fibroblastos, células endoteliales, células epiteliales, condrocitos, osteoblastos, progenitores de células dendríticas, células intersticiales derivadas de la médula, células T, macrófagos, y neutrófilos. IL-17 induce la producción y expresión de varias citoquinas, quimioquinas, receptores, moléculas de adhesión, enzimas y similar actuando sobre estas células. Específicamente, se pueden mencionar CXCL1 (KC o Gro $\alpha$ ), CXCL2 (MIP2 o Gro $\beta$ ), CXCL5 (LIX), CXCL6 (GCP-2), CXCL8 (IL-8), CXCL9 (MIG), CXCL10 (IP10), CXCL11 (I-TAC), CCL2 (MCP-1), CCL5 (RANTES), CCL7 (MCP-3), CCL11 (Eotaxina), CXCL12 (SDF-1), CCL20 (MIP3 $\alpha$ ), IL-1, IL-6, IL-19, TNF, CSF2 (GM-CSF), CSF3 (G-CSF), ICAM-1, VCAM-1, PTGS2 (COX2), NOS2 (iNOS), LCN2 (24p3), DEFB4 (BD2), S100A7 (Psoriasina), S100A8 (Calgranulina A), S100A9 (Calgranulina B), MUC5AC, MUC5B, EREG, SOCS3, TNFSF11 (RANKL), MMP1, MMP3, MMP9, MMP13, TIMP1, ADAMTS4, PGE2, SCF, CD80, CD86, MHC y similares. Por tanto, el aptámero o complejo de la presente divulgación se puede usar como un medicamento, fármaco diagnóstico, fármaco de examen, o reactivo para enfermedades asociadas con estas células y citoquinas, quimioquinas y similares.

Al unirse a un receptor de IL-17, IL-17 activa Act1 y TRAF6, y activa la ruta de NF- $\kappa$ B, la ruta de MAP quinasa, la ruta de C/EBP y similares. Por tanto, el aptámero o complejo de la presente divulgación se puede usar como un medicamento, fármaco diagnóstico, fármaco de examen, o reactivo para enfermedades asociadas con estas rutas de transducción de señales.

El aptámero de la presente divulgación o complejo se puede usar para la profilaxis o tratamiento de enfermedades inflamatorias y enfermedades autoinmunitarias y similares (por ejemplo, esclerosis múltiple (EM), lupus eritematoso sistémico (LES), espondilitis anquilosante (EA), síndrome de Sjögren, polimiositis (PM), dermatomiositis (DM), artritis reumatoide (AR), artrosis, enfermedad intestinal inflamatoria (enfermedad de Crohn y similar), esclerosis sistémica (PSS), esclerodermia, periarteritis nodosa (PN), enfermedad de la glándula tiroides (enfermedad de Graves, tiroiditis de Hashimoto, y similares), síndrome de Guillain-Barré, cirrosis biliar primaria (CBP), púrpura trombocitopénica idiopática, anemia hemolítica autoinmunitaria, miastenia grave (MG), esclerosis lateral amiotrófica (ELA), diabetes mellitus de tipo I, psoriasis en placa, psoriasis pustular, asma, anomalías funcionales de neutrófilos, neumonía eosinofílica, fibrosis pulmonar idiopática, neumonía hipersensible), cáncer (por ejemplo, cáncer esofágico, cáncer de tiroides, cáncer de vejiga urinaria, cáncer colorrectal, cáncer gástrico, cáncer pancreático, cáncer de pecho, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, cáncer de pulmón no microcítico, cáncer de mama, neuroblastoma, glioblastoma, cáncer uterino, cáncer cervical, cáncer ovárico, tumor de Wilms, cáncer de próstata, osteosarcoma), enfermedad de trasplante (por ejemplo, rechazos a injertos, enfermedad del injerto contra el huésped), alergia (por ejemplo, rinitis alérgica, dermatitis atópica, hipersensibilidad alimentaria, urticaria, neumonitis de hipersensibilidad), enfermedades asociadas a ANCA, distrofia muscular de Duchenne, enfisema, edema pulmonar, tuberculosis pulmonar, neumonitis de hipersensibilidad, proteinosis pulmonar, linfangioleiomiomatosis pulmonar (LAM), neumotórax, pleuritis, adhesión posoperatoria, endometriosis, periodontitis adulta, bronquitis, enfermedades pulmonares obstructivas crónicas (EPOC), infecciones, degeneración macular senil, retinopatía, glaucoma, cataratas, uveítis, enfermedad de Behcet, hepatitis, cirrosis, insuficiencia hepática, infarto renal, nefritis, insuficiencia renal, cistitis, infarto cerebral, hemorragia cerebral, hemorragia intracraneal, hemorragia subaracnoide, encefalopatía hipersensible, embolia cerebral, ataque isquémico cerebral transitorio, osteomielitis, artritis piogénica, osteoporosis, hernia de disco intervertebral, y gota.

El medicamento de la presente divulgación puede ser uno formulado con un soporte farmacéuticamente aceptable. Los ejemplos del soporte farmacéuticamente aceptable incluyen, pero no están limitados a, excipientes tal como sacarosa, almidón, manitol, sorbitol, lactosa, glucosa, celulosa, talco, fosfato de calcio, y carbonato de calcio; aglutinantes tal como celulosa, metilcelulosa, hidroxilpropilcelulosa, polipropilpirrolidona, gelatina, goma arábiga,

5 polietilenglicol, sacarosa, y almidón; disgregantes tal como almidón, carboximetilcelulosa, hidroxilpropilalmidón, glicol-almidón sódico, hidrogenocarbonato de sodio, fosfato de calcio, y citrato de calcio; lubricantes tal como estearato de magnesio, Aerosil, talco y lauril sulfato de sodio; agentes saborizantes tal como ácido cítrico, mentol, glicirricina-sal de amonio, glicina, y polvo de naranja; conservantes tal como benzoato de sodio, hidrogenosulfito de sodio, metilparabeno, y propilparabeno; estabilizantes tal como ácido cítrico, citrato de sodio y ácido acético; suspensión tal como metilcelulosa, polivinilpirrolidona, y estearato de aluminio; dispersante tal como tensioactivos; diluyentes tal como agua, solución salina, y zumo de naranja; ceras base tal como manteca de cacao, polietilenglicol, y parafina blanca, y similares.

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

15 El medicamento de la presente divulgación se puede recubrir por un método conocido por sí para el fin de enmascarar el sabor, disolución entérica, liberación sostenida y similares. Como ejemplos de agentes de recubrimiento usados para el recubrimiento se usan hidroxipropilmetilcelulosa, etilcelulosa, hidroximetilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, polioxiteilenglicol, Tween 80, Pluronic F68, ftalato acetato de celulosa, ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa, succinato acetato de hidroximetilcelulosa, Eudragit (fabricado por Rohm, Alemania, copolímero de ácido metacrílico/ácido acrílico), pigmentos (por ejemplo, rojo óxido férrico, dióxido de titanio y similares) y similares. El medicamento puede ser una preparación de liberación rápida o una preparación de liberación sostenida. Los ejemplos de bases de liberación sostenida incluyen liposoma, atelocolágeno, gelatina, hidroxapatita, PLGA y similares.

20 Como preparaciones adecuadas para la administración parenteral (por ejemplo, administración intravenosa, administración subcutánea, administración intramuscular, administración tópica, administración intraperitoneal, administración intranasal, administración pulmonar y similares), están disponibles líquidos inyectables estériles isotónicos acuosos y no acuosos, que pueden comprender un antioxidante, una solución tampón, un agente bactericida, un agente de isotonicidad y similares. También se pueden mencionar suspensiones estériles acuosas y no acuosas, que pueden comprender un agente de suspensión, un solubilizante, un espesante, un estabilizante, un antiséptico y similares. La preparación se puede incluir en un envase tal como una ampolla o un vial en un volumen de dosis unitaria o en varias dosis divididas. Un principio activo y un soporte farmacéuticamente aceptable también se pueden liofilizar y almacenar en un estado que se pueda disolver o suspender en un vehículo estéril apropiado justo antes del uso. Además de inyecciones líquidas, también son aceptables inhalantes y pomadas. En el caso de un inhalante, un principio activo en un estado liofilizado se puede micronizar y administrar por inhalación usando un dispositivo de inhalación apropiado, inhalación usando un nebulizador o similar. Un inhalante se puede mezclar según sea apropiado con un tensioactivo convencionalmente usado, aceite, aderezo, ciclodextrina o derivado de la misma y similares según se requiera.

30 Aquí, los ejemplos del tensioactivo incluyen ácido oleico, lecitina, dioleato de dietilenglicol, oleato de tetrahidroflurilo, oleato de etilo, miristato de isopropilo, trioleato de glicerilo, monolaurato de glicerilo, monooleato de glicerilo, monoestearato de glicerilo, monolisinoato de glicerilo, alcohol cetílico, alcohol estearílico, polietilenglicol 400, cloruro de cetilpiridinio, trioleato sorbitano (nombre comercial Span 85), monooleato sorbitano (nombre comercial Span 80), monolaurato sorbitano (nombre comercial Span 20), aceite de ricino endurecido con polioxietileno (nombre comercial HCO-60), polioxietileno (20) monolaurato sorbitano (nombre comercial Tween 20), polioxietileno (20) monooleato sorbitano (nombre comercial Tween 80), lecitina de origen de recurso natural (nombre comercial, EPICLON), éter de oleilpolioxietileno (2) (nombre comercial Brij 92), éter de estearilpolioxietileno (2) (nombre comercial Brij 72), éter de lauril polioxietileno (4) (nombre comercial Brij 30), éter de oleilpolioxietileno (2) (nombre comercial Genapol 0-020), copolímero en bloque de oxietileno y oxipropileno (nombre comercial, Synperonic) y similares. Los ejemplos del aceite incluyen aceite de maíz, aceite de oliva, aceite de semilla de algodón, aceite de girasol y similares. En el caso de una pomada, una base farmacéuticamente aceptable apropiada (vaselina amarilla, vaselina filante, parafina, plastibase, silicona, pomada blanca, cera de abeja, sebo, aceites vegetales, pomada hidrofílica, vaselina hidrofílica, lanolina purificada, lanolina hidrolizada, pomada que absorbe agua, plastibase hidrofílica, pomada de macrogol y similares) se mezcla con un principio activo, y se usa como una preparación.

35 Se puede producir un inhalante según un método convencional. Específicamente, se puede producir un inhalante moliendo o licuando el aptámero o complejo de la presente divulgación descrito anteriormente, mezclándolo en un propelante y/o soporte de inhalación, y cargándolos en un recipiente de inhalación apropiado. Cuando el aptámero o complejo de la presente divulgación descrito anteriormente es un polvo, se puede usar un inhalador de polvo mecánico normal; en el caso de un líquido, se puede usar un inhalador tal como un nebulizador. Aquí, como el propelante, uno convencionalmente conocido se puede usar ampliamente; se pueden mencionar los compuestos de la serie clorofluorocarbono, tal como clorofluorocarbono-11, clorofluorocarbono-12, clorofluorocarbono-21, clorofluorocarbono-22, clorofluorocarbono-113, clorofluorocarbono-114, clorofluorocarbono-123, clorofluorocarbono-

142c, clorofluorocarbono-134a, clorofluorocarbono-227, clorofluorocarbono-C318, y 1,1,1,2-tetrafluoroetano, hidrocarburos tal como propano, isobutano y n-butano, éteres tal como éter dietílico, gases comprimidos tal como gas nitrógeno y gas dióxido de carbono y similares.

5 La dosis del fármaco de la presente divulgación varía dependiendo del tipo y actividad del principio activo, gravedad de la enfermedad, especie animal que es el sujeto de administración, tolerancia al fármaco del sujeto de administración, peso corporal, edad y similares, y la dosis habitual, basada en la cantidad de principio activo por día para un adulto, puede ser de aproximadamente 0,0001 hasta aproximadamente 100 mg/kg, por ejemplo, de aproximadamente 0,0001 hasta aproximadamente 10 mg/kg, preferiblemente de aproximadamente 0,005 hasta aproximadamente 1 mg/kg.

15 La presente divulgación también proporciona un soporte de fase sólida que tiene el aptámero o el complejo de la presente divulgación inmovilizado en el mismo. Como ejemplos del soporte de fase sólida, se pueden mencionar un sustrato, una resina, una placa (por ejemplo, placa multipocillo), un filtro, un cartucho, una columna, y un material poroso. El sustrato puede ser uno usado en matrices de ADN, matrices de proteína y similares; por ejemplo, se pueden mencionar sustratos de níquel-PTFE (politetrafluoroetileno), sustratos de vidrio, sustratos de apatita, sustratos de silicio, sustratos de alúmina y similares, y sustratos preparados recubriendo estos sustratos con un polímero y similar. Como ejemplos de la resina, se pueden mencionar partículas de agarosa, partículas de sílice, un copolímero de acrilamida y N,N'-metilenbisacrilamida, partículas de divinilbenceno entrecruzado con poliestireno, partículas de dextrano entrecruzado con epíclorohidrina, fibra de celulosa, polímeros entrecruzados de alidextrano y N,N'-metilenbisacrilamida, polímeros sintéticos monodispersados, polímeros hidrofílicos monodispersados, Sepharosa, Toyopearl y similares, y también se incluyeron resinas preparadas uniendo varios grupos funcionales a estas resinas. El soporte de fase sólida de la presente divulgación puede ser útil en, por ejemplo, purificar, detectar y cuantificar IL-17.

25 El aptámero o complejo de la presente divulgación se puede inmovilizar sobre un soporte de fase sólida por un método conocido por sí. Por ejemplo, se puede mencionar un método que introduce una sustancia de afinidad (por ejemplo, las descritas anteriormente) o un grupo funcional predeterminado en el aptámero o el complejo de la presente divulgación, y después inmovilizar el aptámero o complejo sobre el soporte de fase sólida a través de la sustancia de afinidad o grupo funcional predeterminado. La presente divulgación también proporciona tales métodos. El grupo funcional predeterminado puede ser un grupo funcional que se puede someter a una reacción de acoplamiento; por ejemplo, se puede mencionar un grupo amino, un grupo tiol, un grupo hidroxilo, y un grupo carboxilo. La presente divulgación también proporciona un aptámero que tiene tal grupo funcional introducido en el mismo.

35 La presente divulgación también proporciona un método de purificar y concentrar IL-17. En particular, la presente divulgación hace posible separar IL-17 de las proteínas de otras proteínas de la familia.

40 Por tanto, en una forma de realización, la presente divulgación proporciona un método de purificación de IL-17, que comprende (a) una etapa de poner en contacto el aptámero o complejo de la presente divulgación con una muestra que contiene IL-17 para permitir la unión de IL-17 en la muestra al aptámero o complejo, y (b) una etapa de separar la IL-17 unida al aptámero o complejo de la muestra.

45 El método de purificación y concentración de la presente divulgación puede comprender adsorber IL-17 al soporte de fase sólida de la presente divulgación, y eluir la IL-17 adsorbida con un eluyente. La adsorción de IL-17 al soporte de fase sólida de la presente divulgación se puede lograr por un método conocido por sí. Por ejemplo, una muestra que contiene IL-17 (por ejemplo, cultivo bacteriano o celular, sobrenadante de cultivo, o sangre) se introduce en el soporte de fase sólida de la presente divulgación o una composición que contiene el mismo. IL-17 se puede eluir usando un eluyente tal como una solución neutra. No hay limitación sobre el eluyente neutro, que puede tener un pH, por ejemplo, de aproximadamente 6 a aproximadamente 9, preferiblemente de aproximadamente 6,5 a aproximadamente 8,5, y más preferiblemente de aproximadamente 7 a aproximadamente 8. La solución neutra también puede comprender, por ejemplo, una sal de potasio (por ejemplo, KCl), una sal de sodio (por ejemplo, NaCl), una sal de magnesio (por ejemplo, MgCl<sub>2</sub>), un tensioactivo (por ejemplo, Tween 20, Triton, NP40), y glicerina. El método de purificación y concentración de la presente divulgación puede comprender además lavar el soporte de fase sólida usando una solución de lavado después de la adsorción de IL-17. Los ejemplos de la solución de lavado incluyen las que contienen urea, un agente quelante (por ejemplo, EDTA), Tris, un ácido, un álcali, ARN de transferencia, ADN, tensioactivos tal como Tween 20, sales tal como NaCl y similares. El método de purificación y concentración de la presente divulgación puede aún comprender además calentar el soporte de fase sólida. Esta etapa permite la regeneración y esterilización del soporte de fase sólida.

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

65

La presente divulgación también proporciona un método de detectar y cuantificar IL-17. En particular, la presente divulgación hace posible detectar y cuantificar IL-17 separadamente de las proteínas de otras proteínas de la familia. El método de detección y cuantificación de la presente divulgación puede comprender medir IL-17 utilizando el aptámero de la presente divulgación (por ejemplo, mediante el uso del complejo y soporte de fase sólida de la presente divulgación).

Por tanto, en una forma de realización, la presente divulgación proporciona un método de detección de IL-17, que comprende (a) una etapa de poner en contacto el aptámero o complejo de la presente divulgación con una muestra de prueba para permitir la unión de IL-17 en la muestra al aptámero o complejo, y (b) una etapa de detectar IL-17 unida al aptámero o complejo.

El método de detectar y cuantificar IL-17 se puede realizar de la misma manera que un método inmunológico, excepto que el aptámero de la presente divulgación se usa en lugar de un anticuerpo. Por tanto, usando el aptámero de la presente divulgación en lugar de un anticuerpo, de la misma manera que tales métodos como ensayo inmunoenzimático (EIA) (por ejemplo, ELISA competitivo directo, ELISA competitivo indirecto, ELISA sándwich), radioinmunoensayo (RIA), inmunoensayo fluorescente (FIA), inmunotransferencia (uso en lugar de un anticuerpo secundario en la técnica de inmunotransferencia), método de tinción inmunohistoquímica, y método de separación celular, se puede realizar la detección y cuantificación. Estos métodos pueden ser útiles no solo en, por ejemplo, medir en contenido en IL-17 en organismos vivos o muestras biológicas, y en diagnosticar una enfermedad asociada con IL-17, sino también para objetos diferentes de un diagnóstico de enfermedad tal como un objeto científico, objeto de experimento y estudio, y similares, incluyendo la detección o cuantificación de IL-17 usando el aptámero de presente divulgación en lugar de un anticuerpo, y una muestra biológica derivada de ser humano o animal diferente de ser humano, o una muestra diferente de muestras biológicas.

La presente invención se describe de aquí en adelante en más detalle por medio de los siguientes ejemplos.

## Ejemplos

### Ejemplo 1-1: Preparación de aptámero que inhibe la unión de IL-17 y el receptor de IL-17 – 1

Los aptámeros representados por los aptámeros No. 1-49 descritos posteriormente se sintetizaron como sigue según el método de la fosforamidita usando un sintetizador automático. Usando un sintetizador de fase sólida y un nucleótido que tiene el extremo 3' portado por una resina como material de partida, el nucleótido se puso en una columna de síntesis, y se pasaron soluciones de reacción a través de la columna de síntesis en el orden de una solución de desprotección, una solución activadora y  $\beta$ -cianoetilfosforamidita del nucleótido adyacente al extremo 3', solución oxidante o reactivo sulfatante, y una solución de protección de nucleótidos sin reaccionar para formar un enlace fosfodiéster o fosforotioato entre los nucleótidos. De la misma manera, una base se extendió y sintetizó cada vez en la dirección 3'  $\rightarrow$  5'. Después de ello, se cortó del soporte en fase sólida, y se eliminaron el grupo protector de la parte base y el grupo protector de la parte ácido fosfórico. Después de ello, se obtuvo un aptámero predeterminado por purificación con cartucho (véase, por ejemplo, el documento JP-A-2001-50381).

La secuencia de nucleótidos de cada uno de los aptámeros obtenidos se muestra posteriormente. Nótese que a, g, c, u son cada uno un ARN en donde la base es adenina, guanina, citosina y uracilo, respectivamente, A, G, C, T son cada uno un ADN en donde la base es adenina, guanina, citosina y timina, respectivamente, mc es un ARN en donde la base es metilcitosina. Los paréntesis en nucleótidos indican modificación del nucleótido, (M) indica que, cuando el nucleótido es un ARN, un grupo hidroxilo en la posición 2' de la ribosa en el mismo está sustituida con un grupo O-metilo, y (F) indica que, cuando el nucleótido es un ARN, un grupo hidroxilo en la posición 2' de la ribosa en el mismo está sustituida con un átomo de flúor. (S) indica que el nucleótido está fosforotioado, y (L) indica modificación con ANB. Por ejemplo, c(F) es citidina en donde un grupo hidroxilo en la posición 2' de la ribosa está sustituido por un átomo de flúor, a(M) es adenosina en donde la posición 2' de la ribosa está sustituida por un grupo O-metilo, y g(M) es guanosina en donde la posición 2' de la ribosa está sustituida por un grupo O-metilo (de aquí en adelante se va a describir de forma similar).

Cada secuencia empieza con el extremo 5', y el terminal es el extremo 3'.

Aptámero No. 1 (SEQ ID NO: 1):

g(L)g(L)g(L)u(F)ag(S)c(F)c(F)g(S)gaggagu(F)c(F)agu(F)aau(F)c(F)ggu(F)amc(L)mc(L)mc(L)

aptámero No. 2:

g(M)g(M)g(M)u(F)ag(S)c(F)c(F)Gg(M)aggagu(F)c(F)agu(F)aau(F)c(F)ggu(F)aCCC

aptámero No. 3:

g(M)g(M)g(M)u(M)a(M)gc(M)c(M)Gg(M)a(F)gg(M)a(M)gu(F)c(F)a(F)gu(F)a(M)a(M)u(M)c(M)g(M)g(M)u(F)ACCC

aptámero No. 4:

g(M)g(M)g(M)u(M)Ag(S)c(M)c(M)Gg(M)a(F)gg(M)a(M)gu(F)c(F)a(F)gu(F)a(M)a(M)u(M)c(M)g(M)g(M)u(F)a(M)CCC

ES 2 682 356 T3

aptámero No. 5 (SEQ ID NO: 2):

g(M)g(M)g(M)g(M)u(M)a(M)g(S)c(M)c(M)Gg(M)a(F)gg(M)a(M)gTc(F)a(F)gTa(M)a(M)u(M)c(M)g(M)g(M)u(F)ACCCC

5 aptámero No. 6:

g(M)g(M)g(M)u(M)a(M)g(S)c(M)c(M)Gg(M)Agg(M)a(M)gTc(F)a(F)gTa(M)a(M)u(M)c(M)g(M)g(M)u(F)ACCC

aptámero No. 7:

10 g(M)g(M)g(M)u(M)Ag(S)c(M)c(M)Gg(M)a(F)gg(M)a(M)gu(F)c(F)a(F)gu(F)aa(M)c(M)g(M)g(M)u(F)a(M)CCC

aptámero No. 8:

g(M)g(M)g(M)u(M)Ag(S)c(M)c(M)Gg(M)a(F)gg(M)a(M)gTc(F)a(F)gTaa(M)c(M)g(M)g(M)u(F)a(M)CCC

aptámero No. 9:

15 g(M)g(M)g(M)u(M)Ag(S)c(M)c(M)Gg(M)a(F)gg(M)a(M)gTc(F)a(F)gTa(M)a(M)u(M)c(M)g(M)g(M)u(F)a(M)CCC

aptámero No. 10:

g(M)g(M)g(M)u(M)a(M)g(S)c(M)c(M)Gg(M)a(F)gg(M)a(M)gTc(F)a(F)gTa(M)Au(M)c(M)g(M)g(M)u(F)ACCC

20 aptámero No. 11:

g(M)g(M)g(M)u(M)Ag(S)c(M)c(M)Gg(M)a(F)gg(M)a(M)gTc(F)a(F)gTa(M)Au(M)c(M)g(M)g(M)u(F)a(M)CCC

aptámero No. 12:

25 g(M)g(M)g(M)u(M)Agc(M)c(M)Gg(M)a(F)gg(M)a(M)gTc(F)a(F)gTa(M)a(M)u(M)c(M)g(M)g(M)u(F)a(M)CCC

aptámero No. 13:

g(M)g(M)g(M)u(M)Agc(M)c(M)Gg(M)a(F)gg(M)a(M)gTc(F)a(F)gTa(M)Au(M)c(M)g(M)g(M)u(F)a(M)CCC

aptámero No. 14:

30 g(M)g(M)g(M)u(M)Ag(F)c(M)c(M)Gg(M)a(F)gg(M)a(M)gTc(F)a(F)gTa(M)a(M)u(M)c(M)g(M)g(M)u(F)a(M)CCC

aptámero No. 15:

g(M)g(M)g(M)u(M)Ag(F)c(M)c(M)Gg(M)a(F)gg(M)a(M)gTc(F)a(F)gTa(M)Au(M)c(M)g(M)g(M)u(F)a(M)CCC

35 aptámero No. 16:

g(M)g(M)g(M)g(M)u(M)Ag(S)c(M)c(M)Gg(M)a(F)gg(M)a(M)gTc(F)a(F)gTa(M)a(M)u(M)c(M)g(M)g(M)u(F)a(M)CCCC

aptámero No. 17:

40 g(M)g(M)g(M)g(M)u(M)Ag(S)c(M)c(M)Gg(M)a(F)gg(M)a(M)gTc(F)a(F)gTa(M)Au(M)c(M)g(M)g(M)u(F)a(M)CCCC

aptámero No. 18:

g(M)g(M)g(M)g(M)u(M)Ag(S)c(M)c(M)Gg(M)a(F)gg(M)a(M)gTc(F)a(F)gTaa(M)c(M)g(M)g(M)u(F)a(M)CCCC

aptámero No. 19:

45 g(M)g(M)g(M)u(M)Ag(S)c(M)c(M)Gg(M)Agg(M)a(M)gTc(F)a(F)gTa(M)a(M)u(M)c(M)g(M)g(M)u(F)a(M)CCC

aptámero No. 20:

g(M)g(M)g(M)u(M)Ag(S)c(M)c(M)Gg(M)Agg(M)a(M)gTc(F)a(F)gTa(M)Au(M)c(M)g(M)g(M)u(F)a(M)CCC

50 aptámero No. 21:

g(M)g(M)g(M)u(M)Ag(S)c(M)c(M)gg(M)Agg(M)a(M)gTc(F)agTaa(M)c(M)g(M)g(M)Ta(M)c(M)c(M)c(M)

aptámero No. 22:

55 g(M)g(M)g(M)u(M)Agc(M)c(M)gg(M)Agg(M)a(M)gTc(F)agTaa(M)c(M)g(M)g(M)Ta(M)c(M)c(M)c(M)

aptámero No. 23:

g(M)g(M)g(M)u(M)Ag(S)c(M)c(M)gg(M)Agg(M)a(M)gTc(F)agTaa(M)c(M)g(M)g(M)TAc(M)c(M)c(M)

aptámero No. 24:

60 g(M)g(M)g(M)u(M)Agc(M)c(M)gg(M)Agg(M)a(M)gTc(F)agTaa(M)c(M)g(M)g(M)TAc(M)c(M)c(M)

aptámero No. 25:

g(M)g(M)g(M)u(M)Agc(M)c(M)gg(M)Agg(M)a(M)gTc(F)agTa(M)Au(M)c(M)g(M)g(M)TAc(M)c(M)c(M)

65 aptámero No. 26:

g(M)g(M)g(M)u(M)Ag(S)c(M)c(M)Gg(M)Agg(M)a(M)gTc(F)agTaa(M)c(M)g(M)g(M)Ta(M)c(M)c(M)c(M)

- aptámero No. 27:  
g(M)g(M)g(M)u(M)Agc(M)c(M)Gg(M)Agg(M)a(M)gTc(F)agTa(M)Au(M)c(M)g(M)g(M)Ta(M)c(M)c(M)c(M)
- 5 aptámero No. 28:  
g(M)g(M)g(M)u(M)Agc(M)c(M)Gg(M)Agg(M)a(M)gTc(F)agTaa(M)c(M)g(M)g(M)Ta(M)c(M)c(M)c(M)
- aptámero No. 29:  
g(M)g(M)g(M)u(M)Agc(M)c(M)Gg(M)Agg(M)a(M)gTc(F)agTa(M)a(M)u(M)c(M)g(M)g(M)Ta(M)c(M)c(M)c(M)
- 10 aptámero No. 30:  
g(M)g(M)g(M)u(M)Agc(M)c(M)Gg(M)Agg(M)a(M)gTc(F)agTa(M)Au(M)c(M)g(M)g(M)Ta(M)c(M)c(M)c(M)
- aptámero No. 31:  
g(M)g(M)g(M)u(M)Ag(S)c(M)c(M)Gg(M)Agg(M)a(M)gTc(F)agTaa(M)c(M)g(M)g(M)TAc(M)c(M)c(M)
- 15 aptámero No. 32:  
g(M)g(M)g(M)u(M)Agc(M)c(M)gg(M)Agg(M)a(M)gTc(F)agTa(M)a(M)u(M)c(M)g(M)g(M)TACCC
- 20 aptámero No. 33:  
g(M)g(M)g(M)u(M)Agc(M)c(M)gg(M)Agg(M)a(M)gTc(F)agTa(M)Au(M)c(M)g(M)g(M)TACCC
- aptámero No. 34:  
g(M)g(M)g(M)u(M)Agc(M)c(M)Gg(M)Agg(M)a(M)gTc(F)AgTa(M)a(M)u(M)c(M)g(M)g(M)Ta(M)c(M)c(M)c(M)
- 25 aptámero No. 35:  
g(M)g(M)g(M)u(M)Agc(M)c(M)Gg(M)Agg(M)a(M)gTc(F)AgTa(M)Au(M)c(M)g(M)g(M)Ta(M)c(M)c(M)c(M)
- aptámero No. 36:  
g(M)g(M)g(M)u(M)AGc(M)c(M)Gg(M)Agg(M)a(M)gTc(F)agTa(M)Au(M)c(M)g(M)g(M)Ta(M)c(M)c(M)c(M)
- 30 aptámero No. 37:  
g(M)g(M)g(M)u(M)Agc(M)c(M)Gg(M)Agg(M)a(M)gTc(F)agTaa(M)c(M)g(M)g(M)Ta(M)c(M)c(M)c(M)
- 35 aptámero No. 38:  
g(M)g(M)g(M)u(M)Agc(M)c(M)Gg(M)Agg(M)a(M)gTc(F)agTa(M)au(M)c(M)g(M)g(M)Ta(M)c(M)c(M)c(M)
- aptámero No. 39:  
g(M)g(M)g(M)u(M)Agc(M)c(M)Gg(M)Agg(M)a(M)gTc(F)AgTaa(M)u(M)c(M)g(M)g(M)Ta(M)c(M)c(M)c(M)
- 40 aptámero No. 40:  
g(M)g(M)g(M)u(M)Agc(M)c(M)Gg(M)Agg(M)a(M)gTc(F)AgTa(M)au(M)c(M)g(M)g(M)Ta(M)c(M)c(M)c(M)
- 45 aptámero No. 41:  
g(M)g(M)g(M)u(M)Agc(M)c(M)Gg(M)agg(M)a(M)gTc(F)agTaa(M)c(M)g(M)g(M)Ta(M)c(M)c(M)c(M)
- aptámero No. 42:  
g(M)g(M)g(M)u(M)Agc(M)c(M)Gg(M)agg(M)a(M)gTc(F)agTaa(M)c(M)g(M)g(M)Ta(M)c(M)c(M)c(M)
- 50 aptámero No. 43:  
g(M)g(M)g(M)u(M)Agc(M)c(M)Gg(M)agg(M)a(M)gTc(F)agTa(M)au(M)c(M)g(M)g(M)Ta(M)c(M)c(M)c(M)
- aptámero No. 44:  
g(M)g(M)g(M)u(M)Agc(M)c(M)Gg(M)agg(M)a(M)gTc(F)AgTa(M)au(M)c(M)g(M)g(M)Ta(M)c(M)c(M)c(M)
- 55 aptámero No. 45:  
g(M)g(M)g(M)u(M)Ag(S)c(M)c(M)Gg(M)agg(M)a(M)gTc(F)agTaa(M)c(M)g(M)g(M)u(F)a(M)CCC
- 60 aptámero No. 46:  
g(M)g(M)g(M)u(M)Ag(S)c(M)c(M)Gg(M)Agg(M)a(M)gTc(F)agTaa(M)c(M)g(M)g(M)u(F)a(M)CCC
- aptámero No. 47:  
g(M)g(M)g(M)u(M)Agc(M)c(M)Gg(M)a(F)gg(M)a(M)gTc(F)a(F)gTaa(M)c(M)g(M)g(M)u(F)a(M)CCC
- 65 aptámero No. 48:  
g(M)g(M)g(M)u(M)Agc(M)c(M)Gg(M)agg(M)a(M)gTc(F)agTaa(M)c(M)g(M)g(M)u(F)a(M)CCC

aptámero No. 49:

g(M)g(M)g(M)u(M)Agc(M)c(M)Gg(M)Agg(M)a(M)gTc(F)agTaa(M)c(M)g(M)g(M)u(F)a(M)CCC

5 Se evaluó si los aptámeros mostrados por los aptámeros No. 1-49 inhiben la unión de IL-17 y el receptor de IL-17 por el método de resonancia de plasmón de superficie.

10 Para la medida, se usó BIAcore2000 fabricado por BIAcore. Se inmovilizó proteína A (21181, PIERCE) en un chip sensor CM5, y una quimera IL-17R recombinante humana-Fc (177-IR, R&D systems) en donde la parte Fc de IgG se fusionó se inmovilizó sobre la misma a aproximadamente 20 RU. Como analito, se mezclaron IL-17 (100 o 150 nM) y un aptámero (50 o 100 nM) mostrado por el aptámero No. 1-49, se mantuvieron durante 15 min y después de eso la mezcla se hizo fluir.

15 Los resultados de la capacidad de unión de IL-17 y el receptor de IL-17 se muestran en la tabla 2 a continuación. En la tabla 2, se muestra un efecto del aptámero de la presente invención sobre la capacidad de unión de IL-17 y el receptor de IL-17 como un valor relativo respecto a la cantidad de unión de IL-17 y el receptor de IL-17 como 100. Además, se produjo el aptámero contra IL-17 descrito en la referencia del estado de la técnica WO 2010/008001 y se usó para comparación con el aptámero de la presente invención. La secuencia del aptámero producido es como se describe a continuación.

20 aptámero No. 50 (SEQ ID NO: 3):  
 ggu(F)c(F)u(F)agc(F)c(F)ggaggagu(F)c(F)agu(F)aa(F)c(F)ggu(F)agac(F)c(F).

25 Los valores mostrados en la tabla 2 indican que el aptámero se une más fuertemente a IL-17 según el valor se vuelve menor, es decir, el aptámero tiene una alta actividad inhibidora de unión contra IL-17 y el receptor de IL-17.

[Tabla 2-1]  
 Actividad de unión de IL-17 y el receptor de IL-17

	Capacidad de unión de IL-17 y el receptor de IL-17 (%)
IL-17	100
aptámero No. 50	37,12
aptámero No. 1	28,63
aptámero No. 2	32,02
aptámero No. 3	25,26
aptámero No. 4	26,78
aptámero No. 5	32,31
aptámero No. 6	25,31
aptámero No. 7	18,37
aptámero No. 8	15,35
aptámero No. 9	8,94
aptámero No. 10	25,23
aptámero No. 11	16,75
aptámero No. 12	24,38
aptámero No. 13	13,75
aptámero No. 14	16,50
aptámero No. 15	14,22
aptámero No. 16	27,95
aptámero No. 17	4,21
aptámero No. 18	13,62
aptámero No. 19	8,46
aptámero No. 20	18,53
aptámero No. 21	22,75
aptámero No. 22	11,58
aptámero No. 23	13,44
aptámero No. 24	15,23
aptámero No. 25	11,73
aptámero No. 26	13,60
aptámero No. 27	13,35
aptámero No. 28	13,24
aptámero No. 29	13,30
aptámero No. 30	14,08
aptámero No. 31	16,18
aptámero No. 32	13,16
aptámero No. 33	15,95

aptámero No. 34	19,52
aptámero No. 35	14,96
aptámero No. 36	18,59
aptámero No. 37	15,53
aptámero No. 38	15,09
aptámero No. 39	14,76
aptámero No. 40	15,49
aptámero No. 41	13,19

[Tabla 2-2]

Actividad de unión de IL-17 y el receptor de IL-17 (continuación)

	Capacidad de unión de IL-17 y el receptor de IL-17 (%)
aptámero No. 42	12,99
aptámero No. 43	15,24
aptámero No. 44	17,88
aptámero No. 45	19,21
aptámero No. 46	20,03
aptámero No. 47	17,65
aptámero No. 48	19,24
aptámero No. 49	19,04

5 Como resultado de la medida, todos los aptámeros alterados-modificados de nuevo mostraron una actividad inhibitora de unión aumentada comparados con el aptámero convencionalmente conocido (aptámero No. 50). Un aptámero que tenía una alta actividad inhibitora mostró aproximadamente 8 veces mayor actividad inhibitora de unión.

10 De lo anterior, se ha mostrado que el aptámero de la presente invención tiene una mayor actividad inhibitora de unión contra la unión de IL-17 y el receptor de IL-17, comparado con aptámeros convencionalmente conocidos.

Ejemplo 1-2: Preparación de aptámero que inhibe la unión de IL-17 y el receptor de IL-17 – 2

15 Los aptámeros representados por los aptámeros No. 52-94 descritos posteriormente se sintetizaron por el mismo método que en el ejemplo 1-1 y usando un sintetizador automático.

20 La secuencia de nucleótidos de cada uno de los aptámeros obtenidos se muestra posteriormente. Nótese que a, g, c, u son cada uno un ARN en donde la base es adenina, guanina, citosina y uracilo, respectivamente, A, G, C, T son cada uno un ADN en donde la base es adenina, guanina, citosina y timina, respectivamente, mc es un ARN en donde la base es metilcitosina. Los paréntesis en nucleótidos indican modificación del nucleótido, (M) indica que, cuando el nucleótido es un ARN, un grupo hidroxilo en la posición 2' de la ribosa en el mismo está sustituido con un grupo O-metilo, y (F) indica que, cuando el nucleótido es un ARN, un grupo hidroxilo en la posición 2' de la ribosa en el mismo está sustituido con un átomo de flúor. (S) indica que el nucleótido está fosforotioado, y (L) indica modificación con ANB. Por ejemplo, c(F) es citidina en donde un grupo hidroxilo en la posición 2' de la ribosa está sustituido por un átomo de flúor, a(M) es adenosina en donde la posición 2' de la ribosa está sustituida por un grupo O-metilo, y g(M) es guanosina en donde la posición 2' de la ribosa está sustituida por un grupo O-metilo (de aquí en adelante se va a describir de forma similar).

30 Cada secuencia empieza con el extremo 5', y el terminal es el extremo 3'.

aptámero No. 52:

g(M)g(M)g(M)u(M)Ag(S)c(M)c(M)Gg(M)a(F)gg(M)a(M)g(S)Tc(F)a(F)gTa(M)a(M)u(M)c(M)g(M)g(M)u(F)a(M)CCC

35 aptámero No. 53:

g(M)g(M)g(M)u(M)Ag(S)c(M)c(M)Gg(M)a(F)gg(M)a(M)gTc(F)a(F)g(S)Ta(M)a(M)u(M)c(M)g(M)g(M)u(F)a(M)CCC

aptámero No. 54:

40 g(M)g(M)g(M)u(M)Ag(S)c(M)c(M)Gg(M)a(F)gg(M)a(M)gUc(F)a(F)gJa(M)a(M)u(M)c(M)g(M)g(M)u(F)a(M)CCC

aptámero No. 55:

g(M)g(M)g(M)u(M)Ag(S)c(M)c(M)Gg(M)a(F)gg(M)a(M)gTc(F)a(F)gTgau(M)c(M)g(M)g(M)u(F)a(M)CCC

aptámero No. 56:

45 g(M)g(M)g(M)u(M)Ag(S)c(M)c(M)Gg(M)a(F)gg(M)a(M)g(S)Tc(F)a(F)g(S)Ta(M)a(M)u(M)c(M)g(M)g(M)u(F)a(M)CCC

aptámero No. 57:

g(M)g(M)g(M)u(M)Ag(S)c(M)c(M)Gg(M)a(F)gg(M)a(M)g(S)Tc(F)a(F)g(M)Ta(M)a(M)u(M)c(M)g(M)g(M)u(F)a(M)CCC

- 5 aptámero No. 58:  
g(M)g(M)g(M)u(M)Ag(S)c(M)c(M)Gg(M)a(F)g(S)g(M)a(M)g(S)Tc(F)a(F)g(M)Ta(M)a(M)u(M)c(M)g(M)g(M)u(F)a(M)CC  
C
- 10 aptámero No. 59:  
g(M)g(M)g(M)u(M)Ag(S)c(M)c(M)Gg(M)a(F)gg(M)a(M)g(S)Tc(F)a(F)g(M)Ta(M)a(M)u(M)c(M)g(M)g(M)u(F)a(M)c(M)c(M)c(M)
- 15 aptámero No. 60:  
g(M)g(M)g(M)u(M)a(M)g(S)c(M)c(M)Gg(M)a(F)gg(M)a(M)g(S)Tc(F)a(F)g(M)Ta(M)a(M)u(M)c(M)g(M)g(M)u(F)a(M)c(M)c(M)c(M)
- 20 aptámero No. 61:  
g(M)g(M)g(M)u(M)Ag(S)c(M)c(M)Gg(M)a(M)gg(M)a(M)g(S)Tc(F)a(F)g(M)Ta(M)a(M)u(M)c(M)g(M)g(M)u(F)a(M)CCC
- 25 aptámero No. 62:  
g(M)g(M)g(M)u(M)a(M)g(S)c(M)c(M)Gg(M)a(F)gg(M)a(M)g(Tc(F)a(F)gTa(M)a(M)u(M)c(M)g(M)g(M)u(F)a(M)c(M)c(M)c(M)
- 30 aptámero No. 63:  
g(M)g(M)g(M)u(M)a(M)g(S)c(M)c(M)Gg(M)a(F)gg(M)a(M)g(S)Tc(F)a(F)g(S)Ta(M)a(M)u(M)c(M)g(M)g(M)u(F)a(M)c(M)c(M)c(M)
- 35 aptámero No. 64:  
g(M)g(M)g(M)u(M)a(M)g(S)c(M)c(M)Gg(M)a(F)gg(M)a(M)g(S)Tc(M)a(F)g(S)Ta(M)a(M)u(M)c(M)g(M)g(M)u(F)a(M)c(M)c(M)c(M)
- 40 aptámero No. 65:  
g(M)g(M)g(M)u(M)a(M)g(S)c(M)c(M)Gg(M)a(F)gg(M)a(M)gTc(F)a(F)gTa(M)a(M)u(M)c(M)g(M)g(M)u(M)a(M)c(M)c(M)c(M)
- 45 aptámero No. 66:  
g(M)g(M)g(M)u(M)a(M)g(S)c(M)c(M)Gg(M)a(F)gg(M)a(M)g(S)Tc(F)a(F)g(S)Ta(M)a(M)u(M)c(M)g(M)g(M)u(M)a(M)c(M)c(M)c(M)
- 50 aptámero No. 67:  
g(M)g(M)g(M)u(M)a(M)g(S)c(M)c(M)Gg(M)a(F)gg(M)a(M)g(S)Tc(M)a(F)g(S)Ta(M)a(M)u(M)c(M)g(M)g(M)u(M)a(M)c(M)c(M)c(M)
- 55 aptámero No. 68:  
g(M)g(M)g(M)u(M)a(M)g(S)c(M)c(M)Gg(M)a(F)gg(M)a(M)g(S)u(F)c(F)a(F)g(S)u(F)a(M)a(M)u(M)c(M)g(M)g(M)u(F)Ac(M)c(M)c(M)
- 60 aptámero No. 69:  
g(M)g(M)g(M)u(M)a(M)g(S)c(M)c(M)Gg(M)a(F)gg(M)a(M)gu(F)c(F)a(F)gu(F)a(M)a(M)u(M)c(M)g(M)g(M)u(F)a(M)c(M)c(M)c(M)
- 65 aptámero No. 70:  
g(M)g(M)g(M)u(M)a(M)g(S)c(M)c(M)Gg(M)a(F)gg(M)a(M)g(S)u(F)c(F)a(F)g(S)u(F)a(M)a(M)u(M)c(M)g(M)g(M)u(F)a(M)c(M)c(M)c(M)
- 70 aptámero No. 71:  
g(M)g(M)g(M)u(M)a(M)g(S)c(M)c(M)Gg(M)a(F)gg(M)a(M)g(S)u(F)c(M)a(F)g(S)u(F)a(M)a(M)u(M)c(M)g(M)g(M)u(F)a(M)c(M)c(M)c(M)
- 75 aptámero No. 72:  
g(M)g(M)g(M)u(M)a(M)g(S)c(M)c(M)Gg(M)a(F)gg(M)a(M)gu(F)c(F)a(F)gu(F)a(M)a(M)u(M)c(M)g(M)g(M)u(M)a(M)c(M)c(M)c(M)
- 80 aptámero No. 73:  
g(M)g(M)g(M)u(M)a(M)g(S)c(M)c(M)Gg(M)a(F)gg(M)a(M)g(S)u(F)c(F)a(F)g(S)u(F)a(M)a(M)u(M)c(M)g(M)g(M)u(M)a(M)c(M)c(M)c(M)
- 85 aptámero No. 74:  
g(M)g(M)g(M)u(M)a(M)g(S)c(M)c(M)Gg(M)a(F)gg(M)a(M)g(S)u(F)c(F)a(F)g(S)u(F)a(M)a(M)u(M)c(M)g(M)g(M)u(F)a(M)c(M)c(M)c(M)

g(M)g(M)g(M)u(M)a(M)gc(M)c(M)Gg(M)a(F)gg(M)a(M)gTc(F)a(F)gTa(M)a(M)u(M)c(M)g(M)g(M)u(F)a(M)c(M)c(M)c(M)  
)

aptámero No. 75:

5 g(M)g(M)g(M)u(M)a(M)gc(M)c(M)gg(M)a(F)gg(M)a(M)gTc(F)a(F)gTa(M)a(M)u(M)c(M)g(M)g(M)u(F)a(M)c(M)c(M)c(M)  
)

aptámero No. 76:

10 g(M)g(M)g(M)u(M)a(M)gc(M)c(M)Gg(M)a(F)gg(M)a(M)gu(F)c(F)a(F)gu(F)a(M)a(M)u(M)c(M)g(M)g(M)u(F)Ac(M)c(M)c(M)  
(M)

aptámero No. 77:

15 g(M)g(M)g(M)u(M)a(M)gc(M)c(M)gg(M)a(F)gg(M)a(M)gu(F)c(F)a(F)gu(F)a(M)a(M)u(M)c(M)g(M)g(M)u(F)Ac(M)c(M)c(M)  
(M)

aptámero No. 78:

20 g(M)g(M)g(M)u(M)a(M)gc(M)c(M)Gg(M)a(F)gg(M)a(M)gTc(F)a(F)gTa(M)a(M)u(M)c(M)g(M)g(M)u(M)a(M)c(M)c(M)c(M)  
(M)

aptámero No. 79:

25 g(M)g(M)g(M)u(M)a(M)gc(M)c(M)gg(M)a(F)gg(M)a(M)gu(F)c(F)a(F)gu(F)a(M)a(M)u(M)c(M)g(M)g(M)u(M)a(M)c(M)c(M)  
(M)c(M)

aptámero No. 80:

30 g(M)g(M)g(M)u(M)a(M)g(S)c(M)c(M)Gg(M)a(F)gg(M)a(M)gu(F)c(F)a(F)gu(F)a(M)a(M)u(M)c(M)g(M)g(M)u(F)Ac(M)c(M)  
(M)c(M)

aptámero No. 81:

35 g(M)g(M)g(M)u(M)a(M)g(S)c(M)c(M)Gg(M)a(M)gg(M)a(M)g(S)Tc(M)a(F)g(S)Ta(M)a(M)u(M)c(M)g(M)g(M)u(M)a(M)c(M)  
(M)c(M)c(M)

aptámero No. 82:

40 g(M)g(M)g(M)u(M)a(M)g(S)c(M)c(M)Gg(M)a(M)gg(M)a(M)g(S)Tc(F)a(F)g(S)Ta(M)a(M)u(M)c(M)g(M)g(M)u(M)a(M)c(M)  
(M)c(M)c(M)

aptámero No. 83:

45 g(M)g(M)g(M)u(M)a(M)g(S)c(M)c(M)Gg(M)a(M)gg(M)a(M)g(S)u(F)c(M)a(F)g(S)u(F)a(M)a(M)u(M)c(M)g(M)g(M)u(F)a  
(M)c(M)c(M)c(M)

aptámero No. 84:

50 g(M)g(M)g(M)u(M)a(M)g(S)c(M)c(M)Gg(M)a(M)gg(M)a(M)g(S)u(F)c(F)a(F)g(S)u(F)a(M)a(M)u(M)c(M)g(M)g(M)u(M)a  
(M)c(M)c(M)c(M)

aptámero No. 85:

55 g(M)g(M)g(M)u(M)a(M)g(S)c(M)c(M)Gg(M)a(M)gg(M)a(M)g(S)u(F)c(F)a(F)g(S)u(F)a(M)a(M)u(M)c(M)g(M)g(M)u(F)a  
(M)c(M)c(M)c(M)

aptámero No. 86:

60 g(M)g(M)g(M)u(M)a(M)g(S)c(M)c(M)Gg(M)a(M)gg(M)a(M)g(S)Tc(M)a(F)g(S)Tg(M)a(M)u(M)c(M)g(M)g(M)u(M)a(M)c(M)  
(M)c(M)c(M)

aptámero No. 87:

65 g(M)g(M)g(M)u(M)a(M)g(S)c(M)c(M)Gg(M)a(M)gg(M)a(M)g(S)Tc(M)a(F)g(S)Tga(M)u(M)c(M)g(M)g(M)u(M)a(M)c(M)  
(M)c(M)

aptámero No. 88:

g(M)g(M)g(M)u(M)a(M)g(S)c(M)c(M)Gg(M)a(M)gg(M)a(M)g(S)u(F)c(M)a(F)g(S)u(F)ga(M)u(M)c(M)g(M)g(M)u(F)a(M)  
(M)c(M)c(M)c(M)

aptámero No. 89:

g(M)g(M)g(M)u(M)a(M)g(S)c(M)c(M)Gg(M)a(M)gg(M)a(M)g(S)Tc(M)a(F)g(S)Taa(M)u(M)c(M)g(M)g(M)u(M)a(M)c(M)  
(M)c(M)

aptámero No. 90:

g(M)g(M)g(M)u(M)a(M)g(S)c(M)c(M)Gg(M)a(M)gg(M)a(M)g(S)Tc(M)a(F)g(S)Ta(M)au(M)c(M)g(M)g(M)u(M)a(M)c(M)  
(M)c(M)

aptámero No. 91:

g(M)g(M)g(M)u(M)a(M)g(S)c(M)c(M)Gg(M)a(M)gg(M)a(M)g(S)Tc(M)a(F)g(S)Taau(M)c(M)g(M)g(M)u(M)a(M)c(M)c(M)c(M)

5

aptámero No. 92:

g(M)g(M)g(M)u(M)a(M)g(S)c(M)c(M)Gg(M)a(M)gg(M)a(M)g(S)u(F)c(F)a(F)g(S)u(F)aa(M)u(M)c(M)g(M)g(M)u(F)a(M)c(M)c(M)c(M)

10

aptámero No. 93:

g(M)g(M)g(M)u(M)a(M)g(S)c(M)c(M)Gg(M)a(M)gg(M)a(M)g(S)u(F)c(F)a(F)g(S)u(F)a(M)au(M)c(M)g(M)g(M)u(F)a(M)c(M)c(M)c(M)

15

aptámero No. 94:

g(M)g(M)g(M)u(M)a(M)g(S)c(M)c(M)Gg(M)a(M)gg(M)a(M)g(S)u(F)c(F)a(F)g(S)u(F)aa(M)c(M)g(M)g(M)u(F)a(M)c(M)c(M)c(M)

Se evaluó si los aptámeros sintetizados inhiben la unión de IL-17 y el receptor de IL-17 por el método de resonancia de plasmón de superficie.

20

Para la medida, se usó BIAcore T100 fabricado por GE Healthcare Bio Sciences. Se inmovilizó proteína A (21181, PIERCE) en un chip sensor CM5, y una quimera IL-17R recombinante humana-Fc (177-IR, R&D systems) en donde la parte Fc de IgG se fusionó se inmovilizó sobre la misma a aproximadamente 750 RU. Como analito, se mezclaron IL-17 (150 nM) y cada aptámero (12,5 o 50 nM) mostrado en la tabla 3, se mantuvieron durante 15 min y después de eso la mezcla se hizo fluir.

25

Los resultados de la capacidad de unión de IL-17 y el receptor de IL-17 se muestran en la tabla 3 a continuación. En la tabla 3, se muestra un efecto del aptámero de la presente invención sobre la capacidad de unión de IL-17 y el receptor de IL-17 como un valor relativo respecto a la cantidad de unión de IL-17 y el receptor de IL-17 como 100. Para comparación con el aptámero de la presente invención se usó un aptámero convencionalmente conocido (aptámero No. 50) contra IL-17.

30

Los valores mostrados en la tabla 3 indican que el aptámero se une más fuertemente a IL-17 según el valor se vuelve menor, es decir, el aptámero tiene una alta actividad inhibidora de unión contra IL-17 y el receptor de IL-17.

35

[Tabla 3]

Actividad de unión de IL-17 y el receptor de IL-17

	Capacidad de unión de IL-17 y el receptor de IL-17 (%)
IL-17	100
aptámero No. 50	37,12
aptámero No. 52	27,55
aptámero No. 53	22,65
aptámero No. 54	25,15
aptámero No. 55	18,99
aptámero No. 56	26,96
aptámero No. 58	33,72
aptámero No. 59	36,54
aptámero No. 60	31,88
aptámero No. 62	25,92
aptámero No. 63	27,10
aptámero No. 64	29,32
aptámero No. 65	20,29
aptámero No. 66	28,71
aptámero No. 68	37,00
aptámero No. 69	18,44
aptámero No. 70	34,97
aptámero No. 72	26,12
aptámero No. 73	31,96
aptámero No. 75	21,57
aptámero No. 76	24,12
aptámero No. 77	23,95
aptámero No. 78	23,28
aptámero No. 79	28,23

aptámero No. 80	25,26
aptámero No. 81	34,26
aptámero No. 82	5,28
aptámero No. 83	33,53
aptámero No. 84	27,74
aptámero No. 85	27,80
aptámero No. 86	35,71
aptámero No. 87	32,40
aptámero No. 89	35,10
aptámero No. 90	41,23
aptámero No. 91	35,10
aptámero No. 92	31,63
aptámero No. 93	30,62
aptámero No. 94	29,32

5 Como resultado de la medida, todos los aptámeros alterados-modificados de nuevo mostraron una actividad inhibitora de unión aumentada comparados con el aptámero convencionalmente conocido (aptámero No. 50). El aptámero que tenía una alta actividad inhibitora mostró aproximadamente 7 veces mayor actividad inhibitora de unión.

De lo anterior, se ha mostrado que el aptámero de la presente invención tiene una alta actividad inhibitora de unión contra la unión de IL-17 y el receptor de IL-17, comparado con aptámeros convencionalmente conocidos.

10 Ejemplo 2-1: Acción inhibitora del aptámero de la presente invención usando la línea celular NIH3T3 de fibroblastos de ratón – 1

15 La línea celular NIH3T3 de fibroblastos de ratón libera extracelularmente IL-6 mediante estimulación celular con IL-17 y TNF $\alpha$ . Utilizando esta propiedad, se seleccionó un aptámero que tiene una acción inhibitora de IL-17.

20 En primer lugar, IL-17 humana y el aptámero producido en el ejemplo 1-1 se preincubaron a 37°C durante 30 min, y se añadieron a células NIH3T3 (ATCC, CRL1658) junto con TNF $\alpha$  de ratón (2 ng/ml). A continuación, después de incubación durante 24 horas, el sobrenadante del cultivo se recogió, y la cantidad de IL-6 se midió por BD Cytometric Bead Array (BD Biosciences). La acción inhibitora contra IL-17 de cada aptámero se determinó a partir de la cantidad de IL-6. Se muestra la concentración inhibitora del 50% (valor CI<sub>50</sub>) en las siguientes tablas 4 y 5. Para comparación con el aptámero de la presente invención, se usó un aptámero convencionalmente conocido (aptámero No. 50).

[Tabla 4]

25 Acción inhibitora contra IL-17 de varios aptámeros en la línea celular de ratón NIH3T3

	CI <sub>50</sub> (nM)
aptámero No. 50	7,36
aptámero No. 1	1,17
aptámero No. 2	0,68
aptámero No. 3	2,08
aptámero No. 4	2,78
aptámero No. 5	0,13
aptámero No. 6	0,77
aptámero No. 7	0,30
aptámero No. 8	0,49
aptámero No. 9	0,64
aptámero No. 10	0,63
aptámero No. 11	0,34
aptámero No. 12	0,52
aptámero No. 13	0,40
aptámero No. 14	0,50
aptámero No. 15	0,63
aptámero No. 16	0,25
aptámero No. 17	0,30
aptámero No. 18	0,15
aptámero No. 19	2,78
aptámero No. 20	0,37
aptámero No. 21	0,39
aptámero No. 22	1,66

aptámero No. 23	1,34
aptámero No. 24	1,77
aptámero No. 25	1,64

[Tabla 5]

Acción inhibitoria contra IL-17 de varios aptámeros en la línea celular de ratón NIH3T3 (continuación)

	CI <sub>50</sub> (nM)
aptámero No. 26	0,78
aptámero No. 27	2,45
aptámero No. 28	2,11
aptámero No. 29	2,53
aptámero No. 30	1,49
aptámero No. 31	0,30
aptámero No. 32	4,62
aptámero No. 33	4,31
aptámero No. 34	2,41
aptámero No. 35	2,47
aptámero No. 37	1,64
aptámero No. 38	0,31
aptámero No. 39	3,91
aptámero No. 40	3,75
aptámero No. 41	0,40
aptámero No. 42	0,51
aptámero No. 43	0,49
aptámero No. 44	1,83
aptámero No. 45	0,76
aptámero No. 46	1,13
aptámero No. 47	0,59
aptámero No. 48	0,30
aptámero No. 49	0,65

5

Como resultado de la medida, los aptámeros nuevamente alterados-modificados mostraron una actividad aumentada aproximadamente de 2 veces a 50 veces comparados con el aptámero convencionalmente conocido (aptámero No. 50).

10 De lo anterior, se ha mostrado que el aptámero de la presente invención inhibe la actividad fisiológica de IL-17 de una manera extremadamente fuerte comparado con aptámeros convencionalmente conocidos.

Ejemplo 2-2: Acción inhibitoria del aptámero de la presente invención usando la línea celular NIH3T3 de fibroblastos de ratón – 2

15

En primer lugar, IL-17 humana y el aptámero producido en el ejemplo 1-2 se preincubaron a 37°C durante 30 min, y se añadieron a células NIH3T3 (ATCC, CRL1658) junto con TNF $\alpha$  de ratón (2 ng/ml). A continuación, después de incubación durante 24 horas, el sobrenadante del cultivo se recogió, y la cantidad de producción de IL-6 se midió por el método de ELISA descrito a continuación. La acción inhibitoria contra IL-17 de cada aptámero se determinó a partir de la cantidad de producción de IL-6. Se muestra la concentración inhibitoria del 50% (valor CI<sub>50</sub>) en la siguiente tabla 6. Para comparación con el aptámero de la presente invención, se usó un aptámero convencionalmente conocido (aptámero No. 50) contra IL-17.

20

25

Método ELISA para verificar la acción inhibitoria contra IL-17 del aptámero: Una placa de microtitulación para ELISA se recubrió con anticuerpo de rata anti-IL-6 de ratón (BD Biosciences, 2  $\mu$ g/ml; 100  $\mu$ l/pocillo) diluido con PBS, y se incubó a 4°C durante la noche. Al día siguiente, la placa de microtitulación se lavó 3 veces con PBS/Tween 20 al 0,05%, y se aplicó bloqueo con PBS/BSA al 1% (200  $\mu$ l/pocillo) a temperatura ambiente durante 2 horas. A continuación, la placa se lavó 3 veces con PBS/Tween 20 al 0,05%. Se añadieron a la placa IL-6 de ratón recombinante (BD Biosciences; 100  $\mu$ l/pocillos) diluida en serie con PBS/BSA al 1%/Tween 20 al 0,05% o sobrenadantes de cultivo (100  $\mu$ l/pocillo). Después de incubación a temperatura ambiente durante 2 horas, la placa se lavó 3 veces con PBS/Tween 20 al 0,05%. A continuación, se añadieron a la placa 100  $\mu$ l/pocillo de anticuerpo de rata anti-IL-6 de ratón conjugado a biotina (BD Biosciences) a una dilución final de 1/500, y la mezcla se hizo reaccionar a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de lavar 3 veces con PBS/Tween 20 al 0,05%, se añadieron 100  $\mu$ l/pocillo de estreptavidina conjugada con fosfatasa alcalina a una dilución final de 1/1000. Después de 30 min a temperatura ambiente, la placa se lavó de nuevo 4 veces con PBS/Tween 20 al 0,05%, y se añadió un sustrato (1-Step PNPP; Thermo Fisher Scientific Inc; 100  $\mu$ l/pocillo). Después de 15 min, se añadió solución acuosa

35

de hidróxido de sodio (2N: 50 µl/pocillo) para parar la reacción, y la placa se leyó en un lector de microtitulación (Bio-Rad) usando un filtro de 405 nm.

[Tabla 6]

5 Acción inhibitora contra IL-17 de varios aptámeros en la línea celular de ratón NIH3T3

	CI <sub>50</sub> (nM)
aptámero No. 50	8,63
aptámero No. 52	1,11
aptámero No. 53	1,67
aptámero No. 55	0,11
aptámero No. 56	0,52
aptámero No. 57	2,36
aptámero No. 59	1,19
aptámero No. 60	2,35
aptámero No. 61	3,41
aptámero No. 62	0,69
aptámero No. 63	0,81
aptámero No. 64	4,64
aptámero No. 65	0,67
aptámero No. 66	1,21
aptámero No. 67	5,95
aptámero No. 68	2,40
aptámero No. 69	1,73
aptámero No. 70	3,28
aptámero No. 71	5,54
aptámero No. 72	2,24
aptámero No. 73	3,46
aptámero No. 74	1,06
aptámero No. 75	1,33
aptámero No. 76	1,70
aptámero No. 77	4,66
aptámero No. 78	1,36
aptámero No. 79	2,25
aptámero No. 80	1,52
aptámero No. 81	2,26
aptámero No. 82	0,48
aptámero No. 84	1,04
aptámero No. 85	0,96
aptámero No. 86	5,16
aptámero No. 87	3,23
aptámero No. 88	2,88
aptámero No. 89	6,21
aptámero No. 90	1,08
aptámero No. 91	3,86
aptámero No. 92	2,60
aptámero No. 93	0,22
aptámero No. 94	0,29

10 Como resultado de la medida, todos los aptámeros nuevamente alterados-modificados mostraron una actividad aumentada comparados con el aptámero convencionalmente conocido (aptámero No. 50). Un aptámero que tiene una alta actividad inhibitora mostró aproximadamente 80 veces mayor actividad.

De lo anterior, se ha mostrado que el aptámero de la presente invención inhibe la actividad fisiológica de IL-17 de una manera extremadamente fuerte comparado con aptámeros convencionalmente conocidos.

15 Ejemplo 3: Acción inhibitora contra IL-17 del aptámero de la presente invención contra células derivadas de tejido conjuntivo

20 Los fibroblastos dérmicos humanos normales (NHDF) liberan extracelularmente IL-6 por estimulación celular con IL-17. Por tanto, usando NHDF como ejemplo de una célula derivada de tejido conjuntivo, la acción inhibitora contra IL-17 de cada aptámero se determinó según el método descrito en Arthritis Rheum. 63, 455-466 (2011).

5 En primer lugar, se sembraron NHDF (Lonza Japan Ltd) en una microplaca de 48 pocillos y se incubó durante 24 horas. A continuación, IL-17 humana (1 o 2 ng/ml) y un aptámero pegilado (5 o 10 ng/ml) modificado por el método descrito en el ejemplo 5 mencionado posteriormente, se preincubaron a 37°C durante 60 min, y se añadieron a NHDF. Después de incubación adicional durante 24 horas, el sobrenadante del cultivo se recogió, y la cantidad de producción de IL-6 se midió por el método de inmunoensayo enzimático (ELISA) (Kit de ELISA de IL-6 humana endógena: Thermo Scientific). La capacidad inhibidora contra IL-17 se calcula de la cantidad de producción de IL-6, y los resultados se muestran en la tabla 7 como una proporción relativa respecto a la capacidad inhibidora de IL-17 del aptámero convencionalmente conocido (aptámero No. 50) contra IL-17 como 1.

10 [Tabla 7]  
Acción inhibidora de IL-17 de varios aptámeros en fibroblastos de piel humanos normales

	capacidad inhibidora contra IL-17
aptámero No. 50	1,00
aptámero No. 1	1,19
aptámero No. 3	1,13
aptámero No. 4	1,21
aptámero No. 5	1,17
aptámero No. 7	1,37
aptámero No. 8	1,38
aptámero No. 9	1,33
aptámero No. 10	1,30
aptámero No. 11	1,37
aptámero No. 12	1,36
aptámero No. 13	1,32
aptámero No. 14	1,12
aptámero No. 16	1,32
aptámero No. 17	1,34
aptámero No. 18	1,34
aptámero No. 19	1,28
aptámero No. 20	1,33
aptámero No. 21	1,73
aptámero No. 22	1,66
aptámero No. 23	1,82
aptámero No. 24	1,70
aptámero No. 25	1,62
aptámero No. 26	1,67
aptámero No. 27	1,78
aptámero No. 28	1,78
aptámero No. 29	1,39
aptámero No. 30	1,46
aptámero No. 31	1,80
aptámero No. 32	1,25
aptámero No. 33	1,30
aptámero No. 34	1,14
aptámero No. 37	1,87
aptámero No. 38	1,84
aptámero No. 39	1,29
aptámero No. 40	1,34
aptámero No. 41	1,53
aptámero No. 42	1,57
aptámero No. 43	1,40
aptámero No. 45	1,79
aptámero No. 46	1,88
aptámero No. 47	1,91
aptámero No. 48	1,78
aptámero No. 49	1,72

15 Como resultado de la medida, los aptámeros nuevamente alterados-modificados mostraron una capacidad inhibidora contra IL-17 aumentada comparados con el aptámero convencionalmente conocido (aptámero No. 50).

De lo anterior, se ha mostrado que el aptámero de la presente invención inhibe la actividad fisiológica de IL-17 de una manera extremadamente fuerte contra células derivadas de tejido conjuntivo comparado con aptámeros convencionalmente conocidos.

Ejemplo 4: Acción inhibitoria contra IL-17 del aptámero de la presente invención contra células derivadas de tejido epitelial

- 5 Los queratinocitos epidérmicos humanos normales (NHEK) liberan extracelularmente IL-6, IL-8 y CCL20 por estimulación celular con IL-17 y TNF $\alpha$ , y las células epiteliales tubulares proximales renales humanas normales (HRPTEC) liberan IL-6, IL-8 y MCP-1 por estimulación celular con IL-17. Por tanto, usando NHEK y HRPTEC como ejemplos de tejido epitelial, se determinó la acción inhibitoria contra IL-17 del aptámero de la presente invención.
- 10 En primer lugar, se sembraron NHEK (KURABO INDUSTRIES LTD.) o HRPTEC (KURABO INDUSTRIES LTD.) en una microplaca de 96 pocillos, y se incubó durante 24 horas. A continuación, IL-17 humana (100 ng/ml) y el aptámero producido en el ejemplo 1-1 se preincubaron a 37°C durante 30 min, y se añadieron a NHEK junto con TNF $\alpha$  humano (10 ng/ml). De forma similar, IL-17 humana (100 ng/ml) y el aptámero producido en el ejemplo 1-1 se preincubaron a 37°C durante 30 min, y se añadieron a HRPTEC. Después de incubación durante 24 horas y 48
- 15 horas, el sobrenadante del cultivo se recogió, y CCL20, IL-6, IL-8 y MCP-1 se midieron por ELISA (Quantikine Human CCL20/MIP-3 ELISA, R&D systems) o BD Cytometric Bead Array.

La acción inhibitoria contra IL-17 de varios aptámeros sobre NHEK se muestra a continuación. Para comparación con el aptámero de la presente invención, se usó un aptámero convencionalmente conocido (aptámero No. 50) contra IL-17.

20

[Tabla 8]  
Proporción de la inhibición de la producción de IL-6

cantidad de aptámero añadida	Proporción de la inhibición de la producción de IL-6 (%)	
	300 nM	30 nM
aptámero No. 50	13,9	0,0
aptámero No. 8	-	24,9
aptámero No. 28	-	14,4
aptámero No. 41	-	29,8
aptámero No. 45	-	24,1
aptámero No. 47	-	20,0
aptámero No. 48	-	33,4

25 -: no realizado

[Tabla 9]  
Proporción de la inhibición de la producción de IL-8

cantidad de aptámero añadida	Proporción de la inhibición de la producción de IL-8 (%)	
	300 nM	30 nM
aptámero No. 50	45,6	0,0
aptámero No. 8	-	58,0
aptámero No. 28	-	22,3
aptámero No. 37	-	18,9
aptámero No. 38	-	25,8
aptámero No. 41	-	47,2
aptámero No. 45	-	55,0
aptámero No. 47	-	20,8
aptámero No. 48	-	49,5

30 -: no realizado

[Tabla 10]  
Proporción de la inhibición de la producción de CCL20

cantidad de aptámero añadida	Proporción de la inhibición de la producción de CCL20 (%)	
	300 nM	30 nM
aptámero No. 50	1,0	0,0
aptámero No. 8	-	35,2
aptámero No. 28	-	28,7
aptámero No. 37	-	12,1
aptámero No. 38	-	12,4
aptámero No. 41	-	79,4
aptámero No. 45	-	28,9
aptámero No. 47	-	34,1

aptámero No. 48	-	71,2
-----------------	---	------

-: no realizado

5 La acción inhibitoria contra IL-17 de varios aptámeros sobre HRPTEC se muestra a continuación. Para comparación con el aptámero de la presente invención, se usó un aptámero convencionalmente conocido (aptámero No. 50) contra IL-17.

[Tabla 11]

Proporción de la inhibición de la producción de IL-6

cantidad de aptámero añadida	Proporción de la inhibición de la producción de IL-6 (%)	
	300 nM	30 nM
aptámero No. 50	47,4	17,5
aptámero No. 8	-	53,5
aptámero No. 25	-	33,1
aptámero No. 28	-	42,8
aptámero No. 37	-	30,7
aptámero No. 38	-	42,7
aptámero No. 41	-	58,9
aptámero No. 45	-	48,2
aptámero No. 47	-	47,1
aptámero No. 48	-	53,8

10 -: no realizado

[Tabla 12]

Proporción de la inhibición de la producción de IL-8

cantidad de aptámero añadida	Proporción de la inhibición de la producción de IL-8 (%)	
	300 nM	30 nM
aptámero No. 50	63,6	40,3
aptámero No. 8	-	73,1
aptámero No. 25	-	56,5
aptámero No. 28	-	60,8
aptámero No. 37	-	55,4
aptámero No. 38	-	64,3
aptámero No. 41	-	79,7
aptámero No. 45	-	70,6
aptámero No. 47	-	71,7
aptámero No. 48	-	72,7

15 -: no realizado

[Tabla 13]

Proporción de la inhibición de la producción de MCP1

cantidad de aptámero añadida	Proporción de la inhibición de la producción de MCP1 (%)	
	300 nM	30 nM
aptámero No. 50	67,9	36,5
aptámero No. 8	-	69,6
aptámero No. 25	-	53,2
aptámero No. 28	-	62,7
aptámero No. 37	-	56,9
aptámero No. 38	-	64,8
aptámero No. 41	-	74,1
aptámero No. 45	-	63,8
aptámero No. 47	-	69,8
aptámero No. 48	-	70,6

20 -: no realizado

25 Como resultado de la medida, los aptámeros nuevamente alterados-modificados suprimieron más fuertemente la producción de citoquinas (IL-6, IL-8) y quimioquinas (CCL20, MCP1) inducida por IL-17 que el aptámero convencionalmente conocido (aptámero No. 50).

De lo anterior, se ha mostrado que el aptámero de la presente invención inhibe la actividad fisiológica de IL-17 de una manera extremadamente fuerte contra células de tejido epitelial comparado con aptámeros convencionalmente conocidos.

5 Ejemplo 5: Prueba de estabilidad en suero I

La estabilidad de cada aptámero en suero humano se evaluó in vitro.

10 Se produjeron aptámeros alterados-modificados añadiendo PEG que tiene un peso molecular de 40 o 80 kDa (SUNBRIGHT GL2-400GS2 fabricado por NOF Corporation, SUNBRIGHT GL2-400TS fabricado por NOF Corporation, SUNBRIGHT GL2-800GS2 fabricado por NOF Corporation, SUNBRIGHT GL4-800GS2 fabricado por NOF Corporation o Y-NHS-40K: forma Y fabricado por Jenkem) al extremo 5' del aptámero producido en el ejemplo 1-1 a través de un enlazador (enlazador ssH amino o enlazador C6 amino), y añadiendo idT (dT invertida) al extremo 3' (referencia a, por ejemplo, documento JP-B-3626503 para el método de producción).

15 El aptámero producido en el ejemplo 1-1 o el aptámero pegilado anteriormente mencionado (100 µM 2 µl) se añadieron a suero humano (36 µl), y la mezcla se dejó reposar a 37°C. Después de un intervalo de 0 horas, 24 horas, 48 horas, 96 horas, se recogieron 4,5 µl de cada y se conservaron a -80°C. Después de ello, se añadieron 0,5 µl de proteasa K (6 mg/ml) a cada una de las muestras descongeladas y se dejaron reposar a 37°C durante 10 min. Además, se añadieron 25,5 µl de una solución de extinción de la reacción (urea 8 M, EDTA 10 mM: ácido etilendiaminotetraacético, BPB al 0,05%: azul de bromofenol) y las mezclas se trataron con calor a 95°C durante 10 min. Cada muestra se sometió a electroforesis en gel de acrilamida en presencia de urea 8 M para separar el aptámero contenido en la muestra. El gel se tiñó con SYBR Green II (Takara Bio Inc.) durante 30 min, y la fluorescencia del ARN se detectó mediante Storm840 Phosphorimager (GE Healthcare Japón). De las imágenes obtenidas, se cuantificó la banda del aptámero intacto, y se calculó la semivida y se evaluó la estabilidad de cada muestra. La semivida de cada muestra se muestra en la siguiente tabla 14. En la tabla 14, además del aptámero convencionalmente conocido mencionado anteriormente contra IL-17 (aptámero No. 50), se produjo otro aptámero contra IL-17 descrito en el documento WO 2010/008001 y se usó para comparación con el aptámero de la presente invención. La secuencia del aptámero producido es como se describe a continuación.

30 aptámero No. 51 (SEQ ID NO: 4):  
GGGGu(F)agc(F)c(F)ggaggagu(F)c(F)agu(F)aa(F)c(F)ggu(F)aCCCC).

35 [Tabla 14]  
Semivida de aptámero en suero humano

	tiempo con PEG (h)	tiempo sin PEG (h)
aptámero No. 50	9,78	8,22
aptámero No. 51	9,59	6,17
aptámero No. 8	57,28	30,14
aptámero No. 25	19,92	14,91
aptámero No. 28	25,30	16,86
aptámero No. 37	22,50	13,03
aptámero No. 38	23,74	11,73
aptámero No. 41	38,72	17,33
aptámero No. 45	52,12	20,09
aptámero No. 47	37,27	26,87
aptámero No. 48	30,27	26,06

40 Como resultado de la medida, todos los aptámeros nuevamente alterados-modificados mostraron semivida prolongada aproximadamente de 2 a 5 veces en suero comprado con los aptámeros convencionalmente conocidos (aptámeros No. 50 y 51). Además, la prolongación de la semivida por modificación con PEG era más marcada en los aptámeros nuevamente alterados-modificados.

45 De lo anterior, se ha mostrado que el aptámero de la presente invención mejora significativamente la estabilidad en suero comparado con aptámeros convencionalmente conocidos.

Ejemplo 6: Prueba de estabilidad en suero II

50 A suero de ratón, suero humano o tampón fosfato (33 µl) se añadió el aptámero producido en el ejemplo 1-1 o 1-2 (100 µM 2,5 µl), y la mezcla se dejó reposar a 37°C durante 24 horas. Después de eso, se recogieron 4 µl y se añadieron a 24 µl de una solución de extinción de la reacción (urea 8 M, EDTA 10 mM: ácido etilendiaminotetraacético, BPB al 0,05%: azul de bromofenol). Después de conservación a -70°C, cada muestra se sometió a electroforesis en gel de acrilamida en presencia de urea 8 M para separar el aptámero contenido en la muestra. El gel se tiñó con SYBR Green II (Takara Bio Inc.) durante 30 min, y la fluorescencia del ARN se detectó

mediante MOLECULAR IMAGER FX (BIO-RAD). De las imágenes obtenidas, se cuantificó la banda del aptámero intacto usando Science Lab 2005 Multi Gauge ver3.0 fabricado por Fujifilm para la banda correspondiente al aptámero residual, y la cantidad residual de cada analito en el suero se midió basada en los resultados obtenidos con tampón fosfato como el 100%.

5

[Tabla 15]

	Cantidad residual en suero de ratón (%) 24 horas después
aptámero No. 50	7,3
aptámero No. 51	5,5
aptámero No. 8	17,1
aptámero No. 48	17,3
aptámero No. 56	17,0
aptámero No. 57	14,6
aptámero No. 58	28,4
aptámero No. 59	59,4
aptámero No. 60	43,4
aptámero No. 61	22,3
aptámero No. 62	81,5
aptámero No. 63	49,5
aptámero No. 64	94,7
aptámero No. 65	48,6
aptámero No. 66	49,1
aptámero No. 67	87,0
aptámero No. 68	63,9
aptámero No. 69	76,8
aptámero No. 70	89,0
aptámero No. 71	83,7
aptámero No. 72	32,3
aptámero No. 73	65,3
aptámero No. 74	33,9
aptámero No. 75	44,4
aptámero No. 76	66,6
aptámero No. 77	50,8
aptámero No. 78	36,6
aptámero No. 79	26,8
aptámero No. 80	66,2
aptámero No. 81	86,8
aptámero No. 82	67,7
aptámero No. 83	76,9
aptámero No. 84	82,9
aptámero No. 85	86,1
aptámero No. 86	79,9
aptámero No. 87	81,1
aptámero No. 88	84,2
aptámero No. 89	92,4
aptámero No. 90	95,4
aptámero No. 91	78,6
aptámero No. 92	79,9
aptámero No. 93	66,8
aptámero No. 94	64,4

[Tabla 16]

10

	Cantidad residual en suero humano (%) 24 horas después
aptámero No. 50	24,9
aptámero No. 51	29,0
aptámero No. 8	76,6
aptámero No. 48	57,7
aptámero No. 56	48,4
aptámero No. 58	37,2
aptámero No. 59	57,1
aptámero No. 60	48,4

aptámero No. 61	52,1
aptámero No. 62	59,6
aptámero No. 63	57,8
aptámero No. 64	90,4
aptámero No. 65	68,2
aptámero No. 66	57,9
aptámero No. 67	107,9
aptámero No. 68	90,1
aptámero No. 69	36,1
aptámero No. 71	79,7
aptámero No. 73	91,4
aptámero No. 76	31,7
aptámero No. 80	52,7
aptámero No. 81	98,9
aptámero No. 82	51,1
aptámero No. 83	81,3
aptámero No. 84	89,1
aptámero No. 85	80,8
aptámero No. 86	94,8
aptámero No. 87	98,5
aptámero No. 88	73,3
aptámero No. 89	99,0
aptámero No. 90	106,8
aptámero No. 91	94,8
aptámero No. 92	92,9
aptámero No. 93	90,6
aptámero No. 94	101,1

5 Como resultado de la medida, todos los aptámeros nuevamente alterados-modificados mostraron cantidad residual aumentada 24 después comparados con los aptámeros convencionalmente conocidos (aptámeros No. 50 y 51). El aptámero más estable mostró una cantidad residual aumentada en suero 24 después de aproximadamente 15 veces.

De lo anterior, se ha mostrado que el aptámero de la presente invención mejora significativamente la estabilidad en suero comparado con aptámeros convencionalmente conocidos.

10 Ejemplo 7: Prueba farmacocinética en ratón

15 Se disolvió un aptámero en solución salina a 1 mg/ml, y se administró por vía intravenosa a un ratón C57BL/6 macho (8 semanas de edad, Charles River) a la dosis de 1 mg/kg. Se recogió la sangre 5, 15, 30 min después, 1, 2, 4, 6, 8, 24 horas después, o 48, 72, 96 horas después. El plasma se separó y conservó a -70°C y, respecto al aptámero de la presente invención, la concentración de ácido nucleico residual en plasma se midió según el método descrito por Judith M. Healy et al., (Pharmaceutical Research, Diciembre 2004, Volumen 21, Número 12, pp 2234-2246) y usando el método de ELOSA (método de hibridación).

20 [Tabla 17]  
Semivida en sangre de ratón

	$t_{1/2}$ (h)
aptámero No. 50	1,79
aptámero No. 51	0,85
aptámero No. 8	6,38
aptámero No. 48	4,29
aptámero No. 9	3,50
aptámero No. 57	3,12
aptámero No. 58	4,24
aptámero No. 64	9,26

25 Como resultado de la medida, todos los aptámeros nuevamente alterados-modificados mostraron semivida aumentada aproximadamente 2-5 veces comparada con aptámeros convencionalmente conocidos (aptámeros No. 50 y 51).

De lo anterior, se ha mostrado que la estabilidad del aptámero de la presente invención en sangre mejoró significativamente comparado con aptámeros convencionalmente conocidos.

Ejemplo 8: Efecto inhibitorio contra IL-17 del aptámero de la presente invención en el modelo de inflamación de bolsa de aire en ratón

5 Si un aptámero alterado-modificado puede inhibir la actividad biológica de IL-17 in vivo se confirmó con el modelo de inflamación de bolsa de aire en ratón mediante referencia a Biochemical Pharmacology 77, 878-887 (2009).

10 En el modelo de inflamación de bolsa de aire en ratón, se usaron ratones C57BL/6J macho (7 semanas de edad, Charles River) (n = 4 o 5). Se afeitó el lomo y, al día siguiente y 4 días después, se inyectó aire (2,5 ml) por vía subcutánea en el lomo. A los 3 días desde la segunda inyección de aire, un aptámero pegilado de la presente invención se administró por vía intraperitoneal por el método descrito en el ejemplo 5 y, 1 hora después, se inyectó una solución acuosa de carboximetilcelulosa al 2% que contenía IL-17 (0,5 mg) en la bolsa de aire para inducir la producción de IL-6. El exudado en la bolsa de aire se recogió 24 horas después de la inyección de IL-17, y la cantidad de IL-6 en el exudado se midió por ELISA. Se calcula la proporción de inhibición de la producción de IL-6 (%) y los resultados se muestran en las tablas 18 y 19 a continuación. En las tablas 18 y 19, se usaron aptámeros convencionalmente conocidos contra IL-17 (aptámeros No. 50 y 51) para comparación con el aptámero de la presente invención.

[Tabla 18]

20 Efectos inhibitorios de varios aptámeros en la producción de IL-6 a la dosis de 10 mg/kg

administración de 10 mg/kg	proporción de inhibición de la producción de IL-6 (%)
aptámero No. 50	50,20
aptámero No. 51	42,86
aptámero No. 8	88,16

[Tabla 19]

25 Efectos inhibitorios de varios aptámeros en la producción de IL-6 a la dosis de 1 mg/kg

administración de 1 mg/kg	proporción de inhibición de la producción de IL-6 (%)
aptámero No. 50	17,48
aptámero No. 51	22,74
aptámero No. 8	70,05
aptámero No. 9	42,77
aptámero No. 16	49,20
aptámero No. 21	36,20
aptámero No. 22	40,98
aptámero No. 23	47,33
aptámero No. 24	32,45
aptámero No. 25	41,94
aptámero No. 26	56,05
aptámero No. 27	52,97
aptámero No. 28	33,29
aptámero No. 37	36,68
aptámero No. 38	45,28
aptámero No. 45	81,74
aptámero No. 46	72,84
aptámero No. 47	63,03
aptámero No. 48	67,50
aptámero No. 49	32,21

30 Como resultado de la medida, se confirmó que todos los aptámeros nuevamente alterados-modificados tenían mayor proporción de inhibición de la producción de IL-6 de aproximadamente 2-5 veces, comparados con los aptámeros convencionalmente conocidos (aptámeros No. 50 y 51) cuando se habían administrado a la misma concentración. Además, se confirmó que incluso cuando la concentración de administración de los aptámeros convencionalmente conocidos (aptámeros No. 50 y 51) se aumentó 10 veces, la proporción de inhibición de la producción de IL-6 de aptámero alterado-modificado era mayor y la actividad inhibitoria contra IL-17 del aptámero de la presente invención aumentó notablemente también in vivo.

35 Ejemplo 9-1: Efecto antiinflamatorio en modelo de psoriasis inducida por IL-23 en ratones – 1

Según el método descrito por Heather L. Rizzo et al., (J Immunol. 186, 1495-1502 (2011)), se examinó un efecto supresor del aptámero de la presente invención en el modelo de psoriasis inducida por IL-23.

En primer lugar, se administró por vía intradérmica PBS (20 µl) que contenía seroalbúmina bovina al 0,1% sola al pabellón auricular izquierdo y se administró por vía intradérmica IL-23 de ratón (eBioscience, 1 µg/20 µl) al pabellón auricular derecho de un ratón C57BL/6 macho (7 semanas de edad, Charles River) una vez al día durante 4 días consecutivos. Después de ello, el aptámero de la presente invención pegilado por el método descrito en el ejemplo 5 (aptámero No. 8) (5 mg/kg) se administró por vía intraperitoneal una vez al día, cada día. Como control positivo, se administró por vía intraperitoneal anticuerpo anti-IL-17 (eBioscience, 100 µg/cabeza) una vez al día, en días alternos y, como control negativo, se administró por vía intraperitoneal solución salina (10 ml/kg) una vez al día, cada día. Después de 24 horas desde la administración final de IL-23 de ratón, se midió el espesor de ambos pabellones auriculares mediante Dial Thickness Gauge (G-1A, PEACOCK), y se evaluó la eficacia del aptámero de la presente invención para dermatitis de tipo psoriasis.

El espesor del pabellón auricular en el grupo de administración del aptámero pegilado de la presente invención (aptámero No. 8) disminuyó significativamente comparado con el del grupo control negativo administrado con solución salina (Fig. 2A). En el grupo de administración de anticuerpo anti-IL-17 usado como control positivo, no se pudo confirmar un efecto notable a la dosis usada en este estudio. En la figura, cada valor muestra la media ± error estándar de la media (n = 4 o 5), y se analizó una diferencia estadísticamente significativa por análisis unidireccional de varianza y método de Dunnett (\*: P<0,05).

Los resultados anteriores sugieren fuertemente que el aptámero de la presente invención contra IL-17 se puede utilizar como un fármaco terapéutico para enfermedades de dermatosis inmunitaria tal como psoriasis.

#### Ejemplo 9-2: Efecto antiinflamatorio en modelo de psoriasis inducida por IL-23 en ratones – 2

Según el método descrito por Heather L. Rizzo et al., (J Immunol. 186, 1495-1502 (2011)), se examinó un efecto supresor del aptámero de la presente invención en el modelo de psoriasis inducida por IL-23.

Es decir, se administró por vía intradérmica PBS (20 µl) que contenía seroalbúmina bovina al 0,1% sola al pabellón auricular izquierdo y se administró por vía intradérmica IL-23 de ratón (eBioscience, 1 µg/20 µl) al pabellón auricular derecho de un ratón C57BL/6 macho (7 semanas de edad, Charles River) una vez al día durante 4 días consecutivos. Después de ello, el aptámero de la presente invención pegilado por el método descrito en el ejemplo 5 (aptámero No. 48) (10 mg/kg) y un aptámero convencionalmente conocido pegilado por un método similar (aptámero No. 51) (10 mg/kg) se administraron por vía intraperitoneal una vez al día durante 5 días consecutivos desde un día antes de la administración intradérmica. Como control positivo, se administró por vía intraperitoneal anticuerpo anti-IL-17 (eBioscience, 100 µg/cabeza) una vez al día, en días alternos desde el día de la administración intradérmica y, como control negativo, se administró por vía intraperitoneal solución salina (10 ml/kg) una vez al día durante 5 días consecutivos desde un día antes de la administración intradérmica. Después de 24 horas desde la administración final de IL-23 de ratón, se midió el espesor de ambos pabellones auriculares mediante Dial Thickness Gauge (G-1A, PEACOCK), y se evaluó la eficacia del aptámero de la presente invención para dermatitis de tipo psoriasis.

El espesor del pabellón auricular en el grupo de administración del aptámero pegilado de la presente invención (aptámero No. 48) y el grupo de administración de anticuerpo anti-IL-17 disminuyó significativamente comparado con el del grupo control negativo administrado con solución salina, pero el espesor del pabellón auricular del grupo de administración con el aptámero convencionalmente conocido pegilado (aptámero No. 51) no mostró una diferencia significativa (Fig. 2B). En la figura, cada valor muestra la media ± error estándar de la media (n = 5), y se analizó una diferencia estadísticamente significativa por análisis unidireccional de varianza y método de Dunnett (\*: P<0,05, \*\*: P<0,01).

Los resultados anteriores sugieren fuertemente que el aptámero de la presente invención contra IL-17 se puede utilizar como un fármaco terapéutico para enfermedades de la piel con componente inmunitario tal como psoriasis.

#### Ejemplo 10: Efecto antiinflamatorio en el modelo de artritis inducida por glucosa-6-fosfato isomerasa en ratones

Según el método descrito por A Ishiguro et al., (Arthritis Rheum. 63, 455-466 (2011)), se examinó el efecto supresor del aptámero de la presente invención en el modelo de artritis inducida por glucosa-6-fosfato isomerasa (GPI).

En primer lugar, a un ratón DBA/1 macho (8 semanas de edad, Charles River) se le administró por vía intradérmica en la base de la cola GPI de ratón (300 µg/cabeza) emulsionado con adyuvante completo (Difco), y la dosificación del aptámero de la presente invención pegilado por el método descrito en el ejemplo 5 (aptámero No. 8) (5 mg/kg) se empezó. El aptámero se administró por vía intraperitoneal una vez al día, en días alternos. Como control, se administró por vía intraperitoneal solución salina una vez al día a una dosis de 10 ml/kg en días alternos. El animal se observó cada día, la inflamación de cada garra se puntuó en 3 niveles desde 0 (sin síntomas) hasta 2 (rojez de la extremidad entera y máxima tumefacción), y se evaluó la eficacia del aptámero de la presente invención sobre artritis.

Comparado con el grupo control administrado con solución salina, la puntuación de artritis del grupo de administración del aptámero pegilado de la presente invención (aptámero No. 8) disminuyó significativamente (día

11 y día 12 después de la inmunización, Fig. 3). En la figura, cada valor muestra la media  $\pm$  error estándar de la media (n = 10), y se analizó una diferencia estadísticamente significativa por método de Wilcoxon-Mann-Whitney (\*: P<0,05, \*\*: P<0,01).

- 5 Los resultados anteriores sugieren fuertemente que el aptámero de la presente invención contra IL-17 se puede utilizar como un fármaco terapéutico para artritis de origen autoinmunitario tal como artritis reumatoide.

Ejemplo 11-1: Efecto antiinflamatorio en el modelo de artritis inducida por colágeno en ratones - 1

- 10 Según el método descrito por S Toyama et al., (Arthritis Res Ther 12, R92 (2010)), se examinó el efecto supresor del aptámero de la presente invención en el modelo de artritis inducida por colágeno.

15 En primer lugar, a un ratón DBA/1 macho (8 semanas de edad, Charles River) se le administró por vía intradérmica en la base de la cola colágeno bovino de tipo II (200  $\mu$ g/cabeza, Collagen Research Center) emulsionado con adyuvante completo (Chondrex) (día 1 del experimento). El día 22 del experimento, al ratón se le dio una dosis de recuerdo de colágeno bovino de tipo II emulsionado con adyuvante incompleto, así como un aptámero de la presente invención pegilado por el método descrito en el ejemplo 5 (aptámero No. 8) (5 mg/kg) se administró por vía intraperitoneal una vez al día, durante 16 días consecutivos. Como control, se administró por vía intraperitoneal solución salina una vez al día a una dosis de 10 ml/kg cada día. El animal se observó cada día, la inflamación de cada garra se puntuó en 3 niveles desde 0 (sin síntomas) hasta 2 (rojez de la extremidad entera y máxima tumefacción), y se evaluó la eficacia del aptámero de la presente invención sobre artritis.

20 Comparado con el grupo control administrado con solución salina, la puntuación de artritis del grupo de administración del aptámero pegilado de la presente invención (aptámero No. 8) disminuyó significativamente (Fig. 4A). En la figura, cada valor muestra la media  $\pm$  error estándar de la media (n = 9 o 10), y se analizó una diferencia estadísticamente significativa por método de Wilcoxon-Mann-Whitney (\*: P<0,05, \*\*: P<0,01).

Ejemplo 11-2: Efecto antiinflamatorio en el modelo de artritis inducida por colágeno en ratones - 2

- 30 Mediante un método similar al del ejemplo 11-1, se examinó el efecto supresor del aptámero de la presente invención en el modelo de artritis inducida por colágeno. Como el aptámero de la presente invención, se usaron un aptámero de la presente invención pegilado por el método descrito en el ejemplo 5 (aptámero No. 64) (5 mg/kg) y un aptámero convencionalmente conocido pegilado por un método similar (aptámero No. 51) (5 mg/kg) y, como control, se administró por vía intraperitoneal solución salina una vez al día a una dosis de 10 ml/kg durante 16 días consecutivos.

35 Comparado con el grupo control administrado con solución salina, la puntuación de artritis del grupo de administración del aptámero pegilado de la presente invención (aptámero No. 64) disminuyó significativamente. Sin embargo, la puntuación de artritis del grupo de administración del aptámero convencionalmente conocido pegilado (aptámero No. 51) no mostró una diferencia significativa (Fig. 4B). En la figura, cada valor muestra la media  $\pm$  error estándar de la media (n = 9), y se analizó una diferencia estadísticamente significativa por método de Wilcoxon-Mann-Whitney (\*: P<0,05, \*\*: P<0,01).

40 Puesto que tanto el modelo de artritis inducido por GPI (ejemplo 10) como el modelo de artritis inducido por colágeno (ejemplos 11-1 y 11-2), muy usados como modelos animales para artritis, demostraron la eficacia del aptámero de la presente invención, se confirmó adicionalmente que el aptámero de la presente invención contra IL-17 se puede utilizar como un fármaco terapéutico para artritis de origen autoinmunitario tal como artritis reumatoide. En particular, se aclaró que el aptámero de la presente invención muestra una actividad más fuerte que aptámeros convencionalmente conocidos.

50 **Aplicabilidad industrial**

El aptámero o el complejo de la presente divulgación puede ser útil como un medicamento o reactivo tal como un reactivo diagnóstico para una enfermedad incluyendo enfermedad inflamatoria, enfermedad autoinmunitaria, cáncer, alergia o infección, y similares. El aptámero o el complejo de la presente divulgación también puede ser útil en purificar y concentrar IL-17, marcaje de IL-17, y detectar y cuantificar IL-17.

**Lista de secuencias**

- 60 <110> LA UNIVERSIDAD DE TOKIO  
ZENYAKU KOGYO KABUSHIKIKAIISHA
- <120> Aptámero contra interleuquina-17 y uso del mismo
- 65 <130> 092157

<150> JP 2013-060817  
 <151> 22-03-2013

<160> 4  
 5 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1  
 <211> 31  
 <212> ADN  
 10 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Aptámero contra interleuquina-17

15 <400> 1  
**ggguagccgg aggagucagu raucgguacc c** 31

<210> 2  
 <211> 33  
 20 <212> ADN  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Aptámero contra interleuquina-17

25 <400>2  
**gggguagccg gaggagtcag taucgguac ccc** 33

<210> 3  
 <211> 33  
 30 <212> ARN  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Aptámero contra interleuquina-17

35 <400> 3  
**ggucuagccg gaggagucag uaucgguag acc** 33

<210> 4  
 <211> 33  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Aptámero contra interleuquina-17

<400> 4  
 50 **gggguagccg gaggagucag uaucgguac ccc** 33

REIVINDICACIONES

1. Un aptámero que comprende una secuencia representada

5 (i) por la siguiente fórmula (Ia), que se une a IL-17 para inhibir la unión de IL-17 y el receptor de IL-17:  
 $g(M)g(M)g(M)u(M)a'(M)g'(X_1)c(M)c(M)g'(M)a'(X_4)g(X_5)g(M)a(M)g(X_5)u'(F)c(X_7)a'(X_2)g(X_6)u'(F)r(X_3)a'(X_3)u(M)c(M)g(M)g(M)u'(X_7)a'(M)c'(M)c'(M)c'(M)$   
 en donde

10 a, g, c y u son cada uno un ARN en donde la base es adenina, guanina, citosina y uracilo, respectivamente,

r es un ARN en donde la base es adenina o guanina,

a', g' y c' son cada uno un ARN o ADN en donde la base es adenina, guanina y citosina, respectivamente,

u' es un ARN en donde la base es uracilo, un ADN en donde la base es uracilo o un ADN en donde la base es timina,

15 los paréntesis en un nucleótido indican modificación del nucleótido,

(M) indica que, cuando el nucleótido es un ARN, un grupo hidroxilo en la posición 2' de la ribosa en el mismo está sustituido por un grupo O-metilo,

(F) indica que, cuando el nucleótido es un ARN, un grupo hidroxilo en la posición 2' de la ribosa en el mismo está sustituido por un átomo de flúor,

20 (X<sub>1</sub>) indica que el nucleótido está sin modificar o fosforotioado, o cuando el nucleótido es un ARN, un grupo hidroxilo en la posición 2' de la ribosa en el mismo está sustituido por un átomo de flúor,

(X<sub>2</sub>) indica que el nucleótido está sin modificar, o cuando el nucleótido es un ARN, un grupo hidroxilo en la posición 2' de la ribosa en el mismo está sustituido por un átomo de flúor,

(X<sub>3</sub>) indica que el nucleótido está sin modificar, o cuando el nucleótido es un ARN, un grupo hidroxilo en la posición 2' de la ribosa en el mismo está sustituido por un grupo O-metilo,

25 (X<sub>4</sub>) indica que el nucleótido está sin modificar, o cuando el nucleótido es un ARN, un grupo hidroxilo en la posición 2' de la ribosa en el mismo está sustituido por un átomo de flúor o un grupo O-metilo,

(X<sub>5</sub>) indica que el nucleótido está sin modificar o fosforotioado,

(X<sub>6</sub>) indica que el nucleótido está sin modificar o fosforotioado, o cuando el nucleótido es un ARN, un grupo hidroxilo en la posición 2' de la ribosa en el mismo está sustituido por un grupo O-metilo, y

30 (X<sub>7</sub>) indica que cuando el nucleótido es un ARN, un grupo hidroxilo en la posición 2' de la ribosa en el mismo está sustituido por un átomo de flúor o un grupo O-metilo; o

35 (ii) por la siguiente fórmula (II), que se une a IL-17 para inhibir la unión de IL-17 y el receptor de IL-17:

$g(x_1)g(x_1)g(x_1)u(F)ag(S)c(F)c(F)g'(S)g(x_2)aggagu(F)c(F)agu(F)aa(F)c(F)ggu(F)ac'(x_3)c'(x_3)c'(x_3)$

en donde

40 a, g, c y u son cada uno un ARN en donde la base es adenina, guanina, citosina y uracilo, respectivamente,

g' y c' son cada uno un ARN o ADN en donde la base es guanina o citosina, respectivamente,

45 los paréntesis en un nucleótido indican modificación del nucleótido,

(F) indica que un grupo hidroxilo en la posición 2' de la ribosa en el nucleótido está sustituido por un átomo de flúor,

(S) indica que, cuando el nucleótido es ARN, está fosforotioado,

45 (x<sub>1</sub>) indica que el nucleótido está modificado con ácido nucleico bloqueado (ANB), o cuando el nucleótido es un ARN, un grupo hidroxilo en la posición 2' de la ribosa en el mismo está sustituido por un grupo O-metilo,

(x<sub>2</sub>) indica que un nucleótido está sin modificar, o cuando el nucleótido es un ARN, un grupo hidroxilo en la posición 2' de la ribosa en el mismo está sustituido por un grupo O-metilo, y

50 (x<sub>3</sub>) indica que un nucleótido está sin modificar, o modificado con ANB

2. El aptámero según la reivindicación 1(i), que comprende una secuencia representada por la siguiente fórmula (Ia')

55  $g(M)g(M)g(M)u(M)a'(M)g(X_5)c(M)c(M)Gg(M)a(X_4)gg(M)a(M)g(X_5)u'(F)c(X_7)a(X_2)g(X_5)u'(F)r(X_3)a(X_3)u(M)c(M)g(M)g(M)u(X_7)a(M)c'(M)c'(M)c'(M)$

en donde a, g, c, u y r, a', c' y u', así como (M), (F) y (X<sub>2</sub>)-(X<sub>5</sub>) y (X<sub>7</sub>) son como se han definido para la fórmula (Ia), y

G es un ADN en donde la base es guanina.

3. El aptámero según la reivindicación 1(i), que comprende una secuencia representada por la siguiente fórmula (I):

60  $g(M)g(M)g(M)u(M)a'(M)g'(X_1)c(M)c(M)g'(M)a'(X_2)gg(M)a(M)gu'(F)c(F)a'(X_2)gu'(F)a(X_3)a'(X_3)u(M)c(M)g(M)g(M)u'(F)a'(M)c'(M)c'(M)c'(M)$

en donde a, g, c, y u, a', g', c' y u', así como (M), (F) y (X<sub>1</sub>)-(X<sub>3</sub>) son como se han definido para la fórmula (Ia).

65 4. El aptámero según la reivindicación 1(i), que comprende una secuencia representada por la siguiente fórmula (Ia'')

$g(M)g(M)g(M)u(M)a'(M)g(X_5)c(M)c(M)Gg(M)a(X_7)g(X_5)g(M)a(M)g(X_5)u'(F)c(X_7)a(F)g(X_6)u'(F)r(X_3)a(X_3)u(M)c(M)g(M)g(M)u(X_7)a'(M)c'(M)c'(M)c'(M)$

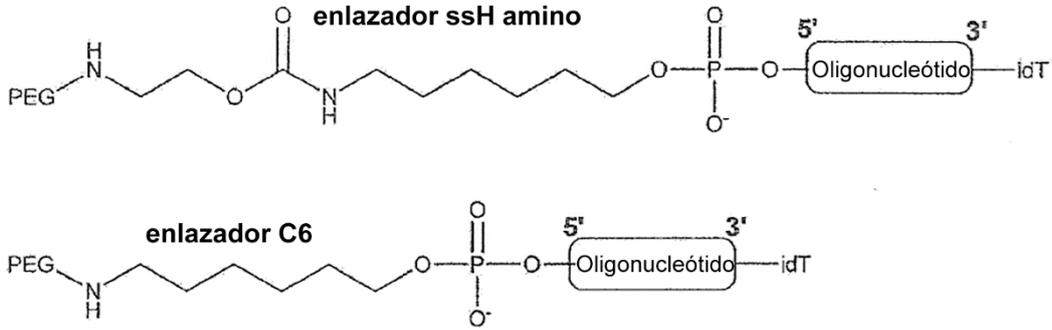
en donde a, g, c, u y r, a', c' y u', así como (M), (F), (X<sub>3</sub>) y (X<sub>5</sub>)-(X<sub>7</sub>) son como se han definido para la fórmula (Ia), y

5 G es un ADN en donde la base es guanina.

5. El aptámero según la reivindicación 4, en donde, en la fórmula (Ia''), c'(M)c'(M)c'(M) en el lado 3' terminal es c(M)c(M)c(M).
- 10 6. El aptámero según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde un nucleótido en donde, cuando es un ARN, un grupo hidroxilo en la posición 2' de la ribosa en el mismo está opcionalmente sustituido por un grupo O-metilo y la base es guanina se añade al extremo 5' de la secuencia representada por la fórmula (Ia), (Ia'), (I) o (Ia''), y/o un nucleótido en donde la base es citosina se añade al extremo 3' del mismo.
- 15 7. El aptámero según la reivindicación 1(i), que comprende la secuencia de cualquiera de los aptámeros No. 52-94.
8. El aptámero según la reivindicación 1(i), que comprende la secuencia de cualquiera de los aptámeros No. 3-49.
- 20 9. El aptámero según la reivindicación 1(ii), que comprende la secuencia mostrada por el aptámero No. 1 o 2.
10. El aptámero según la reivindicación 1 a 9, que tiene una longitud de bases de no más de 70.
- 25 11. El aptámero según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, que está modificado con dT invertida o polietilenglicol.
12. Un complejo que comprende el aptámero según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 y una sustancia funcional.
- 30 13. Un medicamento que comprende el aptámero según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 o el complejo según la reivindicación 12.
14. Un medicamento para uso en el tratamiento o profilaxis de una enfermedad incluyendo enfermedad inflamatoria, enfermedad autoinmunitaria, cáncer, alergia o infección, que comprende el aptámero según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 o el complejo según la reivindicación 12.
- 35 15. Un reactivo diagnóstico, una sonda de detección, o un soporte para la purificación de IL-17, que comprende el aptámero según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 o el complejo según la reivindicación 12.
- 40 16. Un método de detectar o purificar IL-17, que comprende usar el aptámero según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 o el complejo según la reivindicación 12.

Fig. 1

Estructura de forma representativa 5'-PEG (dos tipos de enlazadores)



Estructura de forma representativa ambos 5',3'-PEG

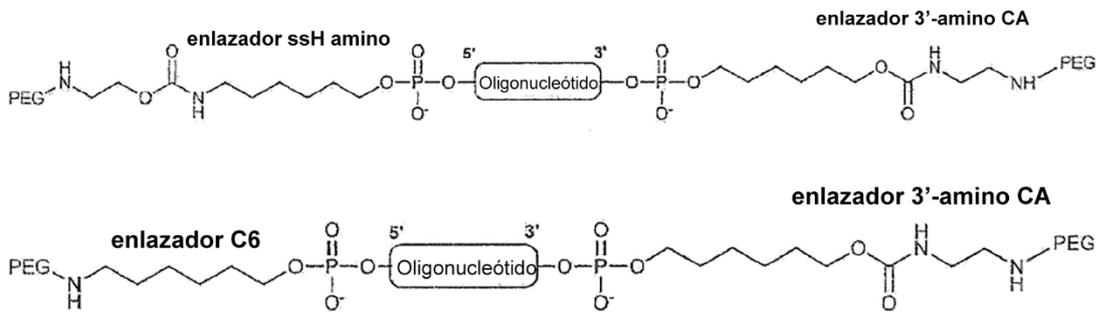
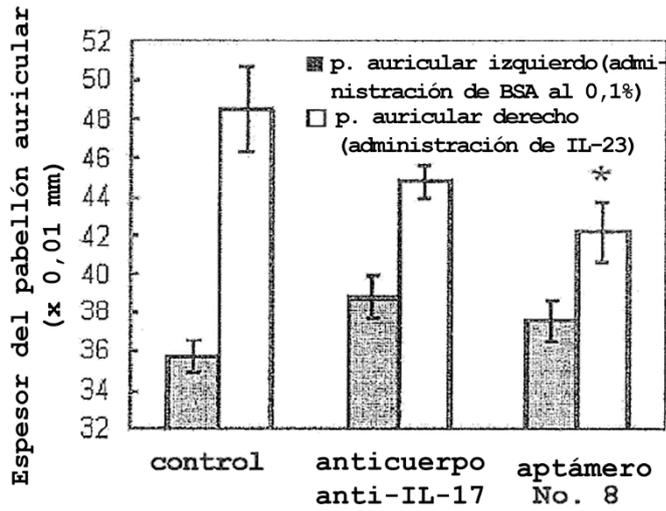


Fig. 2

Efecto supresor en modelo de psoriasis inducida por IL-23 en ratón

A



B

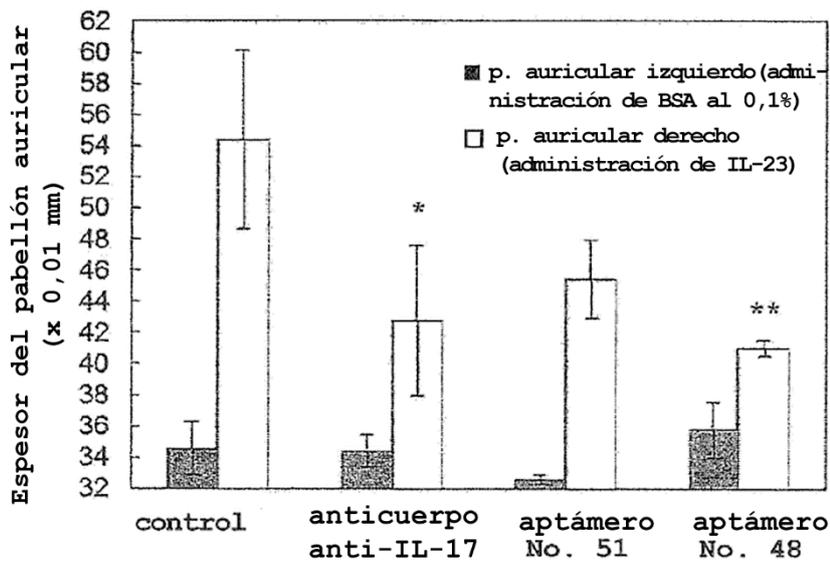


Fig. 3

Efecto supresor de artritis en modelo de artritis inducida por glucosa-6-fosfato isomerasa en ratones

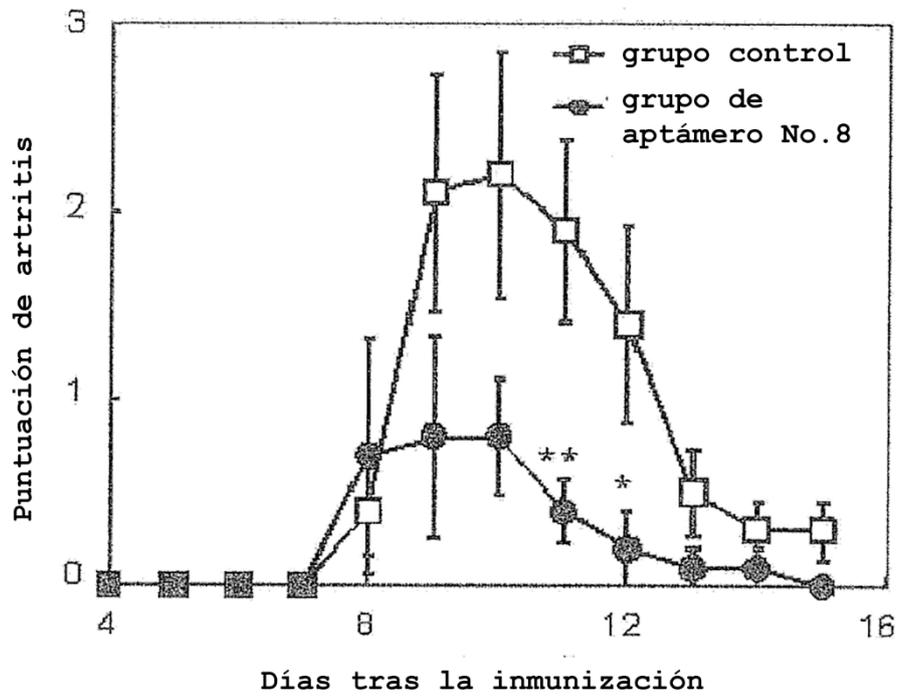
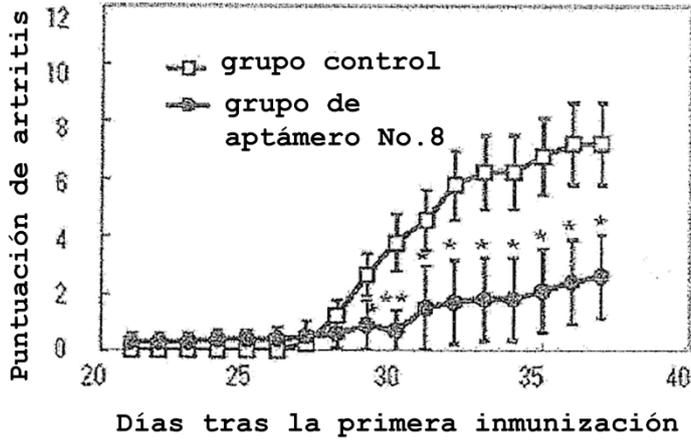


Fig. 4

Efecto supresor del inicio de artritis en modelo de artritis inducida por colágeno en ratones

A



B

