

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 687 154**

51 Int. Cl.:

C12N 15/115 (2010.01)

A61K 31/7088 (2006.01)

A61K 31/712 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

A61P 37/04 (2006.01)

C12N 15/09 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.09.2012 PCT/JP2012/075252**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.04.2013 WO13047844**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.09.2012 E 12835044 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.06.2018 EP 2762569**

54 Título: **Aptámero para NGF y sus aplicaciones**

30 Prioridad:

28.09.2011 JP 2011213585

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

23.10.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**JIN, LING y
HIRAMATSU, HISANAO**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 687 154 T3

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

DESCRIPCIÓN

Aptámero para NGF y sus aplicaciones

Campo técnico de la invención

La presente invención se refiere a un aptámero para NGF y a su uso.

5 Antecedentes de la técnica

El factor de crecimiento nervioso (NGF) fue la primera neurotrofina identificada en 1951, y es una importante proteína secretora involucrada en el desarrollo y la supervivencia de las neuronas periféricas y centrales. Consiste en 118 aminoácidos, tiene un peso molecular de 13 kDa y tiene enlaces S-S en 3 posiciones en una molécula.

10 Como receptores de NGF, se conocen el receptor de tipo tirosina quinasa TrkA con alta afinidad y p75 con baja afinidad que pertenece a una superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral. Estos receptores actúan como un homodímero o heterodímero y están profundamente involucrados en el desarrollo y mantenimiento del sistema nervioso. TrkA es un receptor transmembrana de un solo paso y tiene una estructura de tirosina quinasa en el dominio intracelular. Cuando se le une el NGF, se produce la fosforilación de la tirosina, la señal se transmite hacia abajo y se produce la promoción de la diferenciación y el mantenimiento de la supervivencia de la célula.

15 Como receptores familiares de TrkA, son conocidos TrkB y TrkC. TrkB está unido a BDNF y NT-4/5, y TrkC está unido a NT-3. p75 muestra una menor especificidad de ligando en comparación con TrkA y también se une a BDNF, NT-3 y NT-4/5 además de NGF. Mientras que p75 es un receptor transmembrana de un solo paso, no tiene un dominio de tirosina quinasa en el lado citoplasmático. Al igual que TrkA, se expresa no solo en las células nerviosas sino también en las células no nerviosas. Se sabe que este receptor participa en la promoción de la diferenciación y el mantenimiento de la supervivencia de la célula, así como que está relacionado con la inducción de la apoptosis y la migración celular. Los resultados del análisis de la estructura cristalina han sugerido que un homodímero de NGF se une a TrkA a 2:2 y a p75 a 2:1. Un homodímero de NGF a veces se une a un heterodímero de TrkA y p75.

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

30 NGF también está relacionado con la inflamación, y se ha observado una mayor expresión de NGF en pacientes con enfermedades inflamatorias y en modelos animales inflamatorios. El lupus eritematoso sistémico, la esclerosis múltiple, la psoriasis, la artritis, la cistitis intersticial, el asma y similares son ejemplos de las mismas. Se ha informado de que el líquido sinovial de pacientes con artritis reumatoide muestra una mayor concentración de NGF. Además, se ha informado del aumento de la expresión de NGF en un modelo de artritis reumatoide en ratas, y un aumento en células mastocitos y expresión incrementada de NGF en un modelo de artritis en ratones.

35 NGF está profundamente involucrado en el dolor. Cuando NGF se administra por vía subcutánea a seres humanos, un dolor profundo, tal como el dolor muscular, continúa durante varios días, y se produce una hiperalgesia del sitio de la inyección. El ratón knockout de NGF y el ratón knockout de TrkA carecen de nervios no mielinizados y no sienten el dolor. Cuando el NGF se administra por vía intraperitoneal a 1 mg/kg a una rata madura, se produce hiperalgesia frente al calor nocivo y estímulos mecánicos. El ratón knockout de NGF muestra hiperalgesia no acompañada por afecciones inflamatorias. Además, se sabe que el gen TrkA de pacientes con insensibilidad congénita al dolor con anhidrosis (CIPA) tiene una anomalía y la sensación de dolor disminuye cuando el gen de NGF tiene una anomalía.

A partir de lo anterior, se aprecia que un inhibidor de NGF puede usarse como un fármaco terapéutico para el dolor tal como el dolor nociceptivo, dolor inflamatorio, dolor neuropático, dolor carcinomatoso, dolor por fibromialgia y similares.

45 En los últimos años, las aplicaciones de los aptámeros de ARN como medicamentos, agentes de diagnóstico y fármacos de prueba han estado llamando la atención; algunos aptámeros de ARN ya han estado en etapa de estudio clínico o en uso práctico. En diciembre de 2004, Macugen, el primer fármaco con aptámero de ARN del mundo, fue aprobado como fármaco terapéutico para la degeneración macular relacionada con la edad en Estados Unidos. Un aptámero de ARN se refiere a un ARN que se une específicamente a una sustancia diana tal como una proteína, y puede prepararse usando el método SELEX (Evolución Sistemática de Ligandos por Enriquecimiento Exponencial) (referencias de patente 1 - 3). En el SELEX, un ARN que se une específicamente a una sustancia diana se selecciona de un grupo de ARNs con aproximadamente 10^{14} secuencias de nucleótidos diferentes. La estructura de ARN utilizada tiene una secuencia aleatoria de aproximadamente 40 residuos, que está flanqueada por secuencias de cebador. Este conjunto de ARN se deja ensamblar con una sustancia diana, y solo el ARN que se ha unido a la sustancia diana se recoge usando un filtro y similares. El ARN recogido se amplifica mediante RT-PCR, y esto se usa como plantilla para la siguiente ronda. Repitiendo esta operación unas 10 veces, se puede adquirir un

aptámero de ARN que se une específicamente a la sustancia diana.

Los fármacos aptámeros, al igual que los fármacos anticuerpos, pueden atacar a los factores extracelulares. Con referencia a muchos artículos científicos y otros materiales de referencia en el dominio público, se considera que los fármacos aptámeros superan potencialmente a los fármacos de anticuerpos en algunos aspectos. Por ejemplo, los aptámeros a menudo muestran una mayor fuerza de unión y una mayor especificidad que los anticuerpos.

Es improbable que los aptámeros experimenten una eliminación inmune, y las reacciones adversas características de los anticuerpos, tales como la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC) y la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), no ocurren con el uso de los aptámeros. Desde el aspecto de la administración, dado que los aptámeros tienen aproximadamente 1/10 del tamaño del anticuerpo, la administración de un fármaco al sitio diana es más fácil. Dado que los aptámeros se producen por síntesis química, se pueden realizar fácilmente varias modificaciones, y es posible reducir los costos mediante la producción a gran escala. Mientras tanto, las semividas en sangre de los aptámeros son generalmente más cortas que las de los anticuerpos; sin embargo, esta propiedad es a veces ventajosa en vistas a la toxicidad. Estos hechos llevan a la conclusión de que incluso cuando se ataca a la misma molécula, los fármacos aptámeros superan potencialmente a los fármacos de anticuerpos.

Además, Binkley et al (Nucleic Acids Res., 23: 3198-05) divulgan ligandos de ARN de alta afinidad para el factor de crecimiento nervioso humano (NGF) que se seleccionaron de combinaciones de ARN al azar usando SELEX [Tuerk, C. y Gold, L. (1990) Science, 249, 505-510]. No se sabe que el factor de crecimiento nervioso, que es una proteína necesaria para el desarrollo de las neuronas, se una a los ácidos nucleicos como parte de su función natural. Binkley et al describen dos de las moléculas de ARN seleccionadas en detalle. Una de ellas está altamente estructurada, plegándose en un nudo falso con un lazo de horquilla adicional; esta estructura proporciona una unión a NGF resistente a la sal. La otra es desestructurada y las concentraciones elevadas de sal inhiben su unión. Estas moléculas compiten entre sí por la unión al NGF. Binkley et al sugieren que sus ARNs pueden proporcionar herramientas de diagnóstico útiles para el estudio de una proteína neurotrófica importante; adicionalmente, ilustran otro ejemplo del potencial de los ácidos nucleicos para tomar parte en nuevas interacciones de unión.

Además, el documento de patente internacional WO2010/143714 describe un aptámero que puede unirse a la quimasa para inhibir la actividad de la quimasa y que comprende la secuencia de nucleótidos representada por la fórmula: X1GAUAGAN1N2UAAX2 (en donde X1 y X2 representan independientemente A o G; y N1 y N2 representan independientemente A, G, C, U o T); un complejo que comprende el aptámero y una sustancia funcional (por ejemplo, una sustancia de afinidad, una sustancia de marcaje, una enzima, un medio de administración de fármaco o un agente medicinal); un agente medicinal o un reactivo que comprende el aptámero o el complejo; un método de detección de quimasa o un método de purificación de quimasa caracterizado por utilizar el aptámero o el complejo; y otros.

Además, el documento de patente internacional WO02/077262 describe un método y dispositivo para llevar a cabo el proceso SELEX automatizado, que incluye formas de realización del proceso de fotoSELEX automatizadas, y formas de realización del proceso SELEX de afinidad automatizadas.

Además, James et al (Journal of Chromatography, 1218: 802-808) divulgan componentes resueltos mediante cromatografía de intercambio aniónico pelicular que son diastereoisómeros que surgen de los dos enlaces fosforotioato. James et al sugieren que la cromatografía de intercambio aniónico pelicular potencia aún más la caracterización de agentes terapéuticos oligonucleotídicos que albergan enlaces limitados de fosforotioato y que tienen hasta 37 bases.

Los presentes inventores han producido un aptámero que se une a NGF e inhibe la unión de NGF y un receptor de NGF, y han descubierto que el aptámero inhibe la actividad de NGF de crecimiento de la neurita (documento de patente 4). El documento de patente 5 describe un aptámero para NGF, que se obtiene mediante SELEX automatizado, y el documento de patente 6 describe un producto alterado y un producto modificado del aptámero obtenido en el documento de patente 4.

[Lista de documentos]

[documentos de patente]

documento de patente 1: documento de patente internacional WO91/19813

documento de patente 2: documento de patente internacional WO94/08050

documento de patente 3: documento de patente internacional WO95/07364

documento de patente 4: documento de patente internacional WO2010/035725

documento de patente 5: documento de patente internacional WO02/077262

documento de patente 6: documento de patente internacional WO03/070984

Compendio de la invención

Problemas a resolver por la invención

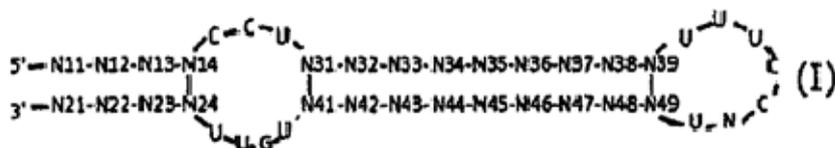
La presente invención tiene como objetivo proporcionar un aptámero para NGF, un método para utilizar el mismo y similares. Particularmente, la presente invención pretende proporcionar un aptámero para NGF adecuado para uso como producto farmacéutico, a saber, un aptámero que tiene una longitud de cadena corta, una gran actividad de inhibición de la activación de NGF (actividad de crecimiento de neurita, actividad de proliferación celular de TF-1), y gran especificidad para NGF.

Medios para resolver los problemas

Los presentes inventores han llevado a cabo estudios intensivos en un intento de resolver los problemas antes mencionados y han tenido éxito en la producción de un aptámero de NGF de mayor calidad que muestra un valor CI_{50} de 1 nM o inferior en cuanto a la inhibición del crecimiento de la neurita, y una actividad inhibidora de crecimiento de neurita notablemente alta en comparación con los aptámeros de NGF convencionalmente conocidos, lo que ha dado como resultado la finalización de la presente invención.

Por consiguiente, la presente invención proporciona lo siguiente.

1. Un aptámero que se une a NGF y es capaz de formar una estructura secundaria potencial representada por la fórmula (I):



en donde N es un nucleótido seleccionado del grupo que consiste en A, G, C, U y T,

N11 - N13 y N21 - N23 son iguales o diferentes y cada uno es un enlace o 1 o 2 nucleótidos seleccionados del grupo que consiste en A, G, C, U y T,

N32 - N38 y N42 - N48 son iguales o diferentes y cada es 1 o 2 nucleótidos seleccionados del grupo que consiste en A, G, C, U y T,

N31, N41, N39 y N49 son iguales o diferentes y cada uno es un nucleótido seleccionado del grupo que consiste en A, G, C, U y T,

N11-N12-N13-N14 y N21-N22-N23-N24 son secuencias de nucleótidos capaces de formar una estructura de tallo en combinación, en donde N14 y N24 forman un par de bases U-a, en donde a es desoxiadenosina

N31-N32-N33-N34-N35-N36-N37-N38-N39 y N41-N42-N43-N44-N45-N46-N47-N48-N49 son secuencias de nucleótidos capaces de formar una estructura de tallo en combinación, en donde N31 y N41, y N39 y N49 forman cada uno un par de bases Watson-Crick, y

en donde el aptámero inhibe la actividad de crecimiento de la neurita y/o la actividad de proliferación celular de NGF.

2. El aptámero según el punto 1, en donde N11 - N13, N21 - N23, N32 - N38 y N42 - N48 son iguales o diferentes y cada uno es un nucleótido seleccionado del grupo que consiste en A, G, C, U y T.

3. El aptámero según el punto 1 o 2, en donde N14 es U, N24 es a, N31 es G, N41 es C, N39 es G y N49 es C.

4. El aptámero según uno cualquiera de los puntos 1 a 3, en donde se forman no menos de 4 pares de bases Watson-Crick entre N32-N33-N34-N35-N36-N37-N38 y N42-N43-N44-N45-N46-N47-N48.

5. El aptámero según el punto 1, que es un ácido nucleico que consiste en una secuencia de nucleótidos seleccionados de la SEQ ID NO: 3, SEQ ID NOS: 9 - 13, SEQ ID NOS: 22 - 29, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NOS: 37 - 98, SEQ ID NOS: 101 - 117 y SEQ ID NOS: 152 - 168 en donde el uracilo puede ser timina.

6. Un aptámero que tiene un ácido nucleico que consiste en una secuencia de nucleótidos seleccionada de SEQ ID NO: 3, SEQ ID NOS: 9 - 13, SEQ ID NOS: 22 - 29, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NOS: 37 - 98, SEQ ID NOS: 101 - 117 y SEQ ID NOS: 152 - 168 en donde el uracilo puede ser timina, en donde de 1 a 6 nucleótidos en dichas secuencias de nucleótidos son sustituidos, eliminados, insertados o añadidos y en donde el aptámero se une a NGF e inhibe la actividad de crecimiento de la neurita y/o la actividad de proliferación celular de NGF.

7. El aptámero según uno cualquiera de los puntos 1 a 6, que tiene una longitud de base de no más de 50.
8. El aptámero según uno cualquiera de los puntos 1 a 7, en donde al menos un nucleótido está modificado.
9. El aptámero según el punto 8, que se modifica con dT invertido (enlace inverso) o polietilenglicol.
10. El aptámero según el punto 9, en donde el dT invertido o el polietilenglicol está unido al extremo 5' o al extremo 3' del aptámero.
11. El aptámero según uno cualquiera de los puntos 8 a 10, en donde los grupos hidroxilo en la posición 2' de una ribosa de los nucleótidos de pirimidina o purina respectivos son iguales o diferentes y no reemplazados o reemplazados con un átomo o grupo seleccionado del grupo que consiste en un átomo de hidrógeno, un átomo de flúor y un grupo metoxi.
12. Una composición farmacéutica, un agente contra el dolor o un agente antiinflamatorio que comprende el aptámero según uno cualquiera de los puntos 1 a 11.
13. El aptámero según uno cualquiera de los puntos 1 a 11, para su uso en el tratamiento o la prevención de una enfermedad que acompaña a un dolor o inflamación.
14. El aptámero según uno cualquiera de los puntos 1 a 11, para su uso en la profilaxis o el tratamiento de una enfermedad que acompaña a un dolor o inflamación.

Efecto de la invención

Dado que el aptámero o ácido nucleico de la presente invención muestra una actividad inhibidora de NGF superior, particularmente una actividad inhibidora del crecimiento de la neurita elevada, debido a la constitución mencionada anteriormente, puede ser útil como medicamento para enfermedades tales como algia, enfermedad inflamatoria y similares.

Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 es un diagrama esquemático de una estructura secundaria predecible del aptámero de NGF mostrado por la SEQ ID NO: 3, en donde la estructura de tallo-bucle en el lado superior izquierdo corresponde a una estructura secundaria de consenso 1.

La Fig. 2 es un diagrama esquemático de la estructura secundaria de consenso 1 representada por la secuencia de nucleótidos del aptámero de NGF que se muestra con la SEQ ID NO: 12.

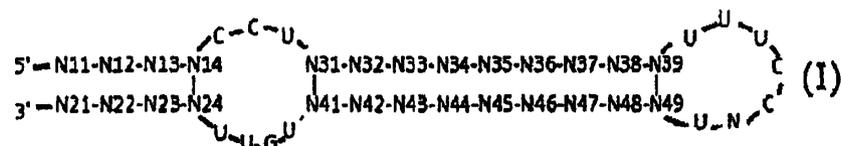
La Fig. 3 es un sensorgrama que muestra que el aptámero de NGF mostrado por la SEQ ID NO: 82 (2) (forma modificada) se une a NGF, NT-3 y NT-4, en donde RU en el eje vertical muestra una unidad relativa, Respuesta Diferencial muestra las diferencias de respuesta, y el eje horizontal muestra el tiempo (segundos) (Tiempo(s)). Estas notaciones en el eje vertical y el eje horizontal son las mismas en las siguientes Figs. 4 - 5.

La Fig. 4 es un sensorgrama que muestra que el aptámero de NGF mostrado por SEQ ID NO: 82 (2) (forma modificada) inhibe la unión de NGF y el receptor de NGF TrkA.

La Fig. 5 es un sensorgrama que muestra que el aptámero de NGF mostrado por SEQ ID NO: 82 (2) (forma modificada) inhibe la unión de NGF y el receptor de NGF p75.

Descripción de las formas de realización

La presente invención proporciona un aptámero que se une a NGF y es capaz de formar una estructura secundaria potencial representada por la fórmula (I):



como se define en las reivindicaciones.

Un aptámero se refiere a una molécula de ácido nucleico que tiene una actividad de unión a una molécula diana específica. El aptámero puede inhibir la actividad de una molécula diana específica uniéndose a la molécula diana específica. El aptámero de la presente invención es un aptámero que tiene una actividad de unión a NGF. Según una forma de realización preferida, el aptámero de la presente invención puede inhibir la actividad de NGF uniéndose a NGF e inhibiendo la unión de NGF y el receptor de NGF.

El aptámero de la presente invención puede ser un ácido nucleico tal como un ARN, un ADN, un ácido nucleico modificado o una mezcla de los mismos. Por consiguiente, el aptámero de la presente invención se puede indicar como "el ácido nucleico de la presente invención" a continuación.

5 El ácido nucleico monocatenario puede tener diversas estructuras secundarias. La "estructura secundaria potencial" significa una estructura secundaria que un cierto ácido nucleico monocatenario puede tomar termodinámicamente en vista de su estructura primaria. Específicamente, la estructura secundaria potencial del aptámero de la presente invención es una estructura secundaria predecible usando el programa MFOLD descrito en el Ejemplo 5. Por consiguiente, incluso un ácido nucleico que no tiene actualmente una estructura secundaria representada por la fórmula (I) mencionada anteriormente es abarcado en el aptámero de la presente invención, siempre que tenga una estructura primaria capaz de formar dicha estructura secundaria.

10 Por lo tanto, preferiblemente, el aptámero de la presente invención es una molécula de ácido nucleico capaz de tener una estructura secundaria representada por la fórmula (I) mencionada anteriormente de forma termodinámicamente estable a la vista de la estructura primaria de la misma. En este sentido, el aptámero de la presente invención es un aptámero capaz de formar una estructura secundaria potencial representada por la fórmula (I).

15 La estructura secundaria potencial representada por la fórmula (I) es lo que se llama una "estructura de tallo-bucle", que es específicamente una estructura que tiene una estructura de bucle (que se describirá como "bucle interno 1" en la presente Descripción) entre la estructura de tallo que puede formarse mediante una combinación de N11-N12-N13-N14 y N21-N22-N23-N24, y la estructura de tallo que se puede formar mediante una combinación de N31-N32-N33-N34-N35-N36-N37-N38-N39 y N41-N42-N43-N44-N45-N46-N47-N48-N49, y además, una estructura de bucle entre N39 y N49 (que se describirá como "bucle 2" en la presente Descripción).

20 La "estructura de tallo" es una estructura en donde las secuencias de nucleótidos parciales que tienen complementariedad en una molécula de ácido nucleico forman pares de bases de Watson-Crick (G-C o A-U/T). En la presente descripción, N11-N12-N13-N14 y N21-N22-N23-N24, y N31-N32-N33-N34-N35-N36-N37-N38-N39 y N41-N42-N43-N44-N45-N46-N47-N48-N49 no necesitan ser completamente complementarios, y se permite el desajuste y/o oscilación de G-U/T. Es decir, siempre que los nucleótidos en ambos extremos de una secuencia de nucleótidos parcial que forma una estructura de tallo formen pares de bases de Watson-Crick, no se requiere necesariamente que todos los demás nucleótidos formen pares de bases de Watson-Crick.

25 En la fórmula (I), "N" posicionada en la sección del bucle 2 es un nucleótido seleccionado del grupo que consiste en A, G, C, U y T.

30 En la fórmula (I), N11 - N13, N21 - N23, N32 - N38 y N42 - N48 son iguales o diferentes y cada uno es un enlace o 1 o 2 nucleótidos seleccionados del grupo que consiste en A, G, C, U y T. Cuando Ni (i es un número entero seleccionado de 11 - 13, 21 - 23, 32 - 38, 42 - 48) muestra "dos nucleótidos", dichos dos nucleótidos pueden ser iguales o diferentes. Cuando Ni muestra "dos nucleótidos" o "un enlace", está preferiblemente contenido en cada secuencia parcial de N11 - N13, N21 - N23, N32 - N38 y N42 - N48 en un número de no más de 2, más preferiblemente no más de 1. Por lo tanto, cada uno de N11 - N14 y N21 - N24 que forma una estructura de tallo puede tener una longitud de nucleótido de 2 - 6, 3 - 5, y cada uno de N31 - N39 y N41 - N49 que forma la otra estructura de tallo puede tener una longitud de nucleótidos de 7 - 11, 8 - 10.

35 El "enlace" mencionado anteriormente significa un enlace sencillo, y cuando cualquier Ni en la fórmula (I) es "un enlace", significa que los nucleótidos adyacentes al nucleótido están unidos entre sí a través de un enlace fosfodiéster.

40 Particularmente preferiblemente, N11 - N13, N21 - N23, N32 - N38 y N42 - N48 son iguales o diferentes y cada uno es un nucleótido seleccionado del grupo que consiste en A, G, C, U y T. Por lo tanto, la estructura de tallo que incluye los dos extremos de la parte que forma la estructura secundaria tiene una longitud de tallo de preferiblemente no más de 4 nucleótidos, y la estructura interna del tallo intercalada entre dos bucles tiene una longitud de tallo de preferiblemente 9 nucleótidos.

45 En la fórmula (I), N14, N24, N31, N41, N39 y N49 son iguales o diferentes y cada uno es un nucleótido seleccionado del grupo que consiste en A, G, C, U y T, y N14 y N24, N31 y N41, y N39 y N49 forman cada uno un par de bases Watson-Crick (G-C o A-U/T). Por lo tanto, una estructura de tallo que contiene los dos extremos de la parte que forma la estructura secundaria forma un par de bases al menos en el extremo del lado de la sección de bucle interno 1, y la estructura de tallo interna intercalada entre los dos bucles forma pares de bases en ambos extremos de los mismos. Más preferiblemente, N14 es U, N24 es A, N31 es G, N41 es C, N39 es G, y N49 es C.

50 Por otro lado, como se definió anteriormente, N11-N12-N13 y N21-N22-N23, y N32-N33-N34-N35-N36-N37-N38 y N42-N43-N44-N45-N46-N47-N48 en la "estructura de tallo" no necesitan ser completamente complementarios (la formación de pares de bases Watson-Crick por todos ellos no es necesaria). Sin embargo, es necesaria la complementariedad en un nivel que permita la formación de una estructura de tallo (el bucle (burbuja) no se forma en el tallo). Para ser específico, dado que se puede formar un bucle cuando están contenidos 3 desajustes continuos u oscilaciones de G-U/T en cada estructura de tallo, cada estructura de tallo está deseablemente libre de 3

desajustes continuos u oscilaciones de G-U/T. También es deseable que no menos del 50%, no menos del 60%, no menos del 70%, de cada uno de N11-N12-N13 y N21-N22-N23, y N32-N33-N34-N35-N36-N37-N38 y N42-N43-N44-N45-N46-N47-N48 sean nucleótidos que forman pares de bases de Watson-Crick.

5 También se describe en este documento un ácido nucleico que consiste en la secuencia de nucleótidos de los siguientes (a) o (b):

(a) una secuencia de nucleótidos seleccionada de SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 9 - 13, SEQ ID NO: 22 - 117 y SEQ ID NO: 152 - 168 (en donde el uracilo puede ser timina);

(b) la secuencia de nucleótidos del punto (a) mencionado anteriormente y la unión a NGF, en donde de 1 a varios nucleótidos están sustituidos, eliminados, insertados o añadidos.

10 Dichos ácidos nucleicos pueden formar una estructura secundaria potencial representada por la fórmula (I) mencionada anteriormente.

15 Mientras que cualquier uracilo en cualquier secuencia puede ser reemplazado por timina, el uracilo a reemplazar puede ser uno en una parte distinta de la sección de bucle interno 1 y la sección de bucle interno 2 en la estructura secundaria potencial antes mencionada, de modo que la actividad del aptámero de la presente invención pueda mantenerse.

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

En el apartado (b) mencionado anteriormente, el número de nucleótidos sustituidos, eliminados, insertados o añadidos es, por ejemplo, aproximadamente de 1 - 10, 1 - 6, 1 - 5, 1 - 3, 1 o 2.

25 En el apartado (b) mencionado anteriormente, aunque la posición del nucleótido a sustituir, eliminar, insertar o añadir no está particularmente limitada, el nucleótido puede estar en una parte distinta de la sección de bucle interno 1 y la sección de bucle interno 2 en la estructura secundaria potencial mencionada anteriormente, de modo que se pueda mantener la actividad del aptámero de la presente invención.

30 Mientras que la longitud de los nucleótidos del aptámero o ácido nucleico de la presente invención no está particularmente limitada, generalmente es de 34 - aproximadamente 200 nucleótidos, 34 - aproximadamente 100 nucleótidos, 36 - 60 nucleótidos, 38 - 44 nucleótidos. La longitud de base del aptámero o ácido nucleico de la presente invención es preferiblemente de no más de 50, y puede ser no más de 44. La síntesis química y la producción en masa del aptámero se vuelven más fáciles al reducir el número total de nucleótidos que caen dentro del intervalo que permite la formación de la estructura secundaria potencial representada por la fórmula (I) mencionada anteriormente, y hay una gran ventaja en términos del costo. Tal aptámero también se considera que permite una fácil modificación química, gran estabilidad en el cuerpo y baja toxicidad.

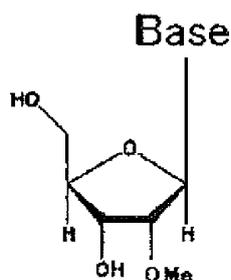
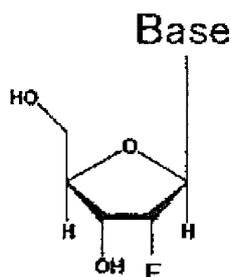
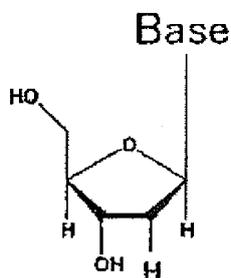
35 El aptámero divulgado en este documento también puede ser un conjugado seleccionado del grupo que consiste en un conjugado de una variedad de ácidos nucleicos que consiste en la secuencia de nucleótidos del apartado (a) mencionado anteriormente, un conjugado de una variedad de ácidos nucleicos que consiste en la secuencia de nucleótidos del apartado (b) mencionado anteriormente, y un conjugado de una variedad de ácidos nucleicos que consisten en la secuencia de nucleótidos del apartado (a) mencionado anteriormente y ácidos nucleicos que consisten en la secuencia de nucleótidos del apartado (b) mencionado anteriormente.

40 Estos conjugados también pueden unirse a NGF y/o inhibir la actividad de NGF (actividad de unión al receptor de NGF, etc.).

45 La conjugación en este documento se puede lograr mediante una unión en tándem. En la conjugación, se puede utilizar un enlazador. Como enlazador, puede ser mencionadas cadenas de nucleótidos (por ejemplo, de 1 a aproximadamente 20 nucleótidos) y cadenas no nucleotídicas (por ejemplo, $-(CH_2)_n$ -enlazador, $-(CH_2CH_2O)_n$ -enlazador, enlazador de hexaetilenglicol, enlazador de TEG, enlazador que contiene péptidos, enlazador que contiene el enlace -SS-, enlazador que contiene el enlace -CONH-, enlazador que contiene el enlace -OPO₃-). El número como se menciona en el conjugado descrito anteriormente de una variedad de los mismos no está particularmente limitado, siempre que sea de dos o más, y el número puede ser, por ejemplo, 2, 3 o 4.

50 Cada nucleótido contenido en el aptámero de la presente invención es igual o diferente y puede ser un nucleótido que comprende un grupo hidroxilo en la posición 2' de la ribosa (por ejemplo, ribosa de nucleótido de pirimidina, ribosa de nucleótido de purina) (es decir, nucleótido no sustituido) o un nucleótido en donde un grupo hidroxilo está reemplazado con cualquier átomo o grupo en la posición 2' de la ribosa. Como ejemplos de cualquier tal átomo o grupo, se pueden mencionar un nucleótido sustituido con un átomo de hidrógeno, un átomo de flúor o un grupo -O-
55 alquilo (por ejemplo, un grupo -O-Me), un grupo -O-acilo (por ejemplo, un grupo -O-CHO), o un grupo amino (por

ejemplo, un grupo -NH₂). En los siguientes casos, el grupo hidroxilo se reemplaza con un átomo de hidrógeno, un átomo de flúor o un grupo -O-Me, respectivamente, en la posición 2' de la ribosa.



5

El aptámero divulgado en este documento también puede ser el nucleótido en donde al menos un tipo (por ejemplo, 1, 2, 3 o 4 tipos) de nucleótido comprende un grupo hidroxilo o el átomo o grupo cualquiera descrito anteriormente, por ejemplo, al menos dos tipos (por ejemplo, 2, 3 o 4 tipos) de grupos seleccionados del grupo que consiste en un átomo de hidrógeno, un átomo de flúor, un grupo hidroxilo y un grupo -O-Me, en la posición 2' de la ribosa.

10 Además, en el aptámero divulgado en este documento, todos los nucleótidos de pirimidina son iguales o diferentes y cada uno puede ser un nucleótido sustituido con un átomo de flúor o un nucleótido sustituido con cualquier átomo o grupo mencionado anteriormente, por ejemplo, un átomo o grupo seleccionado del grupo que consiste en un átomo de hidrógeno, un grupo hidroxilo y un grupo metoxi en la posición 2' de la ribosa.

15 En los aptámeros divulgados en este documento, además, todos los nucleótidos de purina son iguales o diferentes y cada uno puede ser un nucleótido sustituido con un grupo hidroxilo, o un nucleótido sustituido con cualquier átomo o grupo mencionado anteriormente, por ejemplo, un átomo o grupo seleccionado del grupo que consiste en un átomo de hidrógeno, un grupo metoxi y un átomo de flúor en la posición 2' de la ribosa.

20 En los aptámeros divulgados en este documento, además, todos los nucleótidos pueden comprender un grupo hidroxilo, o cualquier átomo o grupo mencionado anteriormente, por ejemplo, el grupo idéntico seleccionado del grupo que consiste en un átomo de hidrógeno, un átomo de flúor, un grupo hidroxilo y un Grupo O-Me en la posición 2' de la ribosa.

25 En esta descripción, se supone que los nucleótidos que constituyen el aptámero son ARNs (es decir, se supone que los grupos de azúcar son ribosa) al describir cómo se modifican los grupos de azúcar en los nucleótidos. Sin embargo, esto no significa que el ADN esté exento de los nucleótidos que constituyen el aptámero, y una modificación del ARN debería leerse como una modificación del ADN, según corresponda. Cuando el nucleótido que constituye el aptámero es ADN, por ejemplo, el reemplazo del grupo hidroxilo en la posición 2' de la ribosa por X debe leerse como un reemplazo de un átomo de hidrógeno en la posición 2' de la desoxirribosa por X.

30 Cuando el uracilo se sustituye con timina en el aptámero de la presente invención, la actividad de unión a NGF, actividad inhibitoria de unión de NGF al receptor de NGF, actividad inhibitoria del crecimiento de la neurita de NGF, actividad inhibitoria de la proliferación celular de NGF, estabilidad, liberación y estabilidad del fármaco en sangre del aptámero y similares se pueden aumentar.

5 El aptámero de la presente invención se une a NGF, que es una neurotrofina conocida, y es una proteína secretora importante implicada en el desarrollo y la supervivencia de las neuronas periféricas y centrales. En la presente invención, NGF significa particularmente un NGF de tipo β . Las secuencias de aminoácidos del β -NGF humano son las mostradas por los Números de Acceso NP002497, P01138, AAI26151, AAI26149 y CAB75625, que también pueden ser una con mutación, su dominio funcional o fragmento peptídico. Puede ser no solo un monómero sino también un dímero o multímero. Además, incluye NGF derivado de mamíferos no humanos, por ejemplo, primates (por ejemplo, monos), roedores (por ejemplo, el ratón, rata, conejillo de indias) y animales de compañía, animales domésticos y animales de trabajo (por ejemplo, el perro, gato, caballo, bovino, cabra, oveja, cerdo).

10 El aptámero de la presente invención inhibe la actividad de NGF uniéndose a NGF e inhibiendo la unión de NGF y el receptor de NGF. El aptámero de la presente invención se puede unir a cualquier parte de NGF siempre que pueda inhibir la unión de NGF y el receptor de NGF.

15 En la presente Descripción, la "actividad inhibidora contra NGF" significa una capacidad inhibidora sobre cualquier actividad que tenga NGF. Por ejemplo, significa una actividad para inhibir la unión del NGF al receptor de NGF, la inhibición de la señal de transducción en la corriente abajo del receptor de NGF (ruta de la quinasa Ras-MAP, ruta de la quinasa PI3), la inhibición de la expresión aumentada de TRPV1, SP, BDNF y similares, actividad inhibidora de expresión de HA, BK, PG, NGF y otras citoquinas liberadas de los mastocitos y similares, que resultan de la unión de NGF al receptor de NGF, además, pueden mencionarse la inhibición de la diferenciación, supervivencia, y crecimiento de la neurita de las células nerviosas inducidos por NGF, aumento de la permeabilidad de los vasos sanguíneos, mejora de la respuesta inmune de las células T y B, diferenciación de los linfocitos, crecimiento y similares de diversas células tales como los mastocitos, células eritroleucémicas, células cancerosas y similares, alivio del dolor, hiperalgesia y similares, inducidos por NGF.

20

La "actividad inhibidora contra NGF" preferible que tiene el aptámero de la presente invención es una actividad para inhibir la unión de NGF al receptor de NGF, una actividad para inhibir la actividad de crecimiento de la neuritas inducida por NGF, actividad para inhibir la actividad de proliferación celular inducida por NGF y similares.

25 El aptámero de la presente invención se une a NGF en un tampón fisiológico (por ejemplo, solución A: véase el Ejemplo 1). El aptámero de la presente invención se une, por ejemplo, a NGF a una intensidad detectable mediante la siguiente prueba.

30 Para la medición, se utiliza un BIAcore2000 fabricado por BIAcore. Un aptámero se inmoviliza en un sensor de chip. La cantidad a inmovilizar se establece en 1000 RU. Se usa un tampón fisiológico que contiene NaCl 0,3 M (solución A: véase el Ejemplo 1) para preparar la solución de NGF (0,5 μ M). Esta solución de NGF (20 μ l) se inyecta y se detecta la unión de NGF al aptámero. Utilizando ARN que contiene un nucleótido aleatorio que consiste en 40 nucleótidos como control negativo, cuando el NGF se une fuertemente de manera significativa al aptámero en comparación con el ARN de control, se valora como que el aptámero tiene capacidad de unión al NGF.

35 En la presente Descripción, el "receptor de NGF" se refiere a una proteína de superficie celular a la que se une NGF. Como receptor de NGF, son conocidos TrkA y p75. El receptor de NGF al que se hace referencia en la presente invención puede ser una proteína que contiene una secuencia de aminoácidos natural o una variante de la misma. Aquí, la "variante de la misma" significa una proteína o péptido en donde se han sustituido varios aminoácidos de una secuencia de aminoácidos de "receptor de NGF", o una secuencia parcial de aminoácidos del mismo, que tiene una actividad de unión a NGF e inhibe la unión de NGF y un receptor de NGF.

40 El aptámero de la presente invención se une a NGF e inhibe la unión de NGF y un receptor de NGF. Si el aptámero inhibe o no la unión de NGF a un receptor de NGF, por ejemplo, puede evaluarse mediante la siguiente prueba.

45 Para la medición, se utiliza un BIAcore2000 fabricado por BIAcore. En un sensor de chip CM5 se inmoviliza una proteína de fusión del receptor de NGF y Fc (por ejemplo, TrkA-Fc (175-TK, R&D systems) o p75-Fc (R&D systems)). La cantidad a inmovilizar es de 500 a 700 RU. Se mezclan NGF (0,1 μ M) y un aptámero (0,2 μ M) en un tampón fisiológico (solución A: véase el Ejemplo 1), y se prepara una mezcla para que sea una muestra durante 30 minutos. Esta mezcla se inyecta en BIAcore2000, y se detecta la unión de NGF al receptor de NGF.

El aptámero de la presente invención puede inhibir tanto la unión de NGF y TrkA, como la de NGF y p75.

50 El aptámero de la presente invención es un aptámero que inhibe la actividad de crecimiento de la neurita de NGF y/o la actividad de proliferación celular de NGF. Si el aptámero de la presente invención puede inhibir la actividad de crecimiento de la neurita del NGF puede evaluarse mediante, por ejemplo, la prueba descrita en el Ejemplo 3. Además, si el aptámero de la presente invención puede inhibir la actividad de proliferación celular de NGF puede evaluarse mediante, por ejemplo, la prueba descrita en el Ejemplo 8.

55 El aptámero de la presente invención se caracteriza por la concentración necesaria para inhibir la actividad de crecimiento de la neurita de NGF por 50% (CI_{50} o 50% de concentración inhibidora), que no debe ser más de 1 nM. Puesto que los aptámeros de NGF convencionalmente conocidos tienen un valor de CI_{50} de aproximadamente varios nM para la actividad de crecimiento de la neurita de NGF, el aptámero de la presente invención muestra una propiedad superior en cuanto a la actividad inhibidora de crecimiento de la neurita.

El aptámero de la presente invención también puede mostrar un valor de Cl_{50} de no más de 1 nM para la actividad de proliferación celular de NGF.

Por otro lado, si el aptámero de la presente invención tiene actividad para inhibir la actividad de proliferación celular de una neurotrofina distinta de NGF, específicamente, el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), neurotrofina-3 (NT-3) y neurotrofina 4/5 (NT-4/5) varía según el aptámero. Aquí, los términos BDNF, NT-3 y NT-4/5 respectivamente significan BDNF, NT-3 y NT-4/5 de todas las especies de mamíferos, incluida la humana.

El nivel de la actividad inhibidora frente a la proliferación celular de otras neurotrofinas (BDNF, NT-3, NT-4/5) se puede evaluar por la prueba descrita en el Ejemplo 16. La actividad inhibidora de la proliferación celular del aptámero de la presente invención como se describe en el Ejemplo 16 y la Tabla 2 se muestra mediante un valor de Cl_{50} de no más de 0,1 nM para NGF, y no menos de 1000 nM para BDNF, lo que significa que el aptámero de la presente invención no inhibe la actividad de proliferación celular de BDNF. Sin embargo, es de 0,97 nM a no menos de 10 nM para NT-3; y no más de 3 nM a no menos de 30 nM para NT-4. Por lo tanto, la inhibición de la actividad de proliferación celular de NT-3 y NT-4 varía dependiendo de los aptámeros.

El aptámero de la presente invención puede ser uno en donde un resto de azúcar (por ejemplo, ribosa) de cada nucleótido se ha modificado para aumentar la actividad de unión a NGF, la actividad inhibidora de unión de NGF al receptor de NGF, la actividad inhibidora del crecimiento de la neurita, la actividad inhibidora de la proliferación celular de NGF, estabilidad, capacidad de liberación del fármaco y estabilidad en la sangre del aptámero y similares. Los ejemplos de la modificación en un residuo de azúcar incluyen la sustitución del átomo de oxígeno en la posición 2', la posición 3' y/o la posición 4' del residuo de azúcar con otro átomo, y similares. Como el tipo de modificación, se pueden mencionar la fluoración, O-alkilación (por ejemplo, O-metilación, O-etilación), O-arilación, S-alkilación (por ejemplo, S-metilación, S-etilación), S-arilación y aminación (por ejemplo, $-NH_2$). Además, ejemplos de los mismos incluyen 4'-SARN en donde el oxígeno de la posición 4' se reemplaza con azufre, LNA (ácido nucleico bloqueado) en donde la posición 2' y la posición 4' están reticuladas a través de metileno, 3'-N-fosforamidato ácido nucleico en donde el grupo hidroxilo en la posición 3' se reemplaza con un grupo amino y similares. Tales alteraciones en el residuo de azúcar se pueden realizar mediante un método conocido per se (véase, por ejemplo, Sproat et al., (1991) Nucl. Acid. Res. 19, 733-738; Cotton et al., (1991) Nucl. Acid Res. 19, 2629-2635; Hobbs et al., (1973) Biochemistry 12, 5138-5145).

El aptámero de la presente invención también puede tener una base de ácido nucleico (por ejemplo, purina o pirimidina) alterada (por ejemplo, sustitución química) para aumentar la actividad de unión a NGF, la actividad inhibidora de unión de NGF al receptor de NGF, la actividad inhibidora del crecimiento de la neurita de NGF, la actividad inhibidora de la proliferación celular de NGF, estabilidad, capacidad de liberación del fármaco y estabilidad en la sangre del aptámero y similares. Como ejemplos de tales alteraciones, puede mencionarse la alteración de pirimidina en la posición 5, alteración de purina en las posiciones 6 y/o 8 (modificación O-metil y similares), alteración con una amina extracíclica, sustitución con 4-tiouridina, sustitución con 5-bromo o 5-yodo-uracilo, modificación del tipo de 5-aminoácido y la modificación de la cadena lateral de 5-triptófano. El grupo fosfato contenido en el aptámero de la presente invención se puede alterar para conferir resistencia a la nucleasa e hidrólisis. Por ejemplo, la región de fosfato del aptámero puede reemplazarse con P (O) S (tioato), P (S) S (ditioato), P (O) NR_2 (amidato), P (O) R, P (O) OR' , CO o CH_2 (formiacetal), P (O) BH_3 (boranofosfato) o 3'-amina ($-NH-CH_2-CH_2-$) [en donde cada unidad de R o R' es independientemente H o un alquilo sustituido o no sustituido (por ejemplo, metilo, etilo)].

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

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

Una alteración adicional se puede realizar mediante la adición a un extremo de un polietilenglicol (en lo sucesivo, a veces a ser descrito como "PEG"), aminoácido, péptido, dT invertido, miristoilo, litocólico-oleilo, docosanoilo, lauroilo, estearoilo, palmitoilo, oleilo, linoleoilo, otros lípidos, esteroides, colesterol, cafeína, vitaminas, pigmentos, sustancias fluorescentes, agente anticancerígeno, toxina, enzimas, sustancia radioactiva, biotina y similares. Para tales alteraciones, véase, por ejemplo, los documentos de patente de Estados Unidos números 5.660.985 y 5.756.703.

En particular, cuando la alteración se lleva a cabo mediante la adición al extremo de PEG, el peso molecular de PEG no está particularmente limitado, y puede ser de 1000 - 100.000, o 30000 - 90000. PEG puede ser lineal o ramificado en dos o más cadenas (PEG multi brazos).

Tal PEG no está particularmente limitado, y los expertos ordinarios en la técnica pueden seleccionar y utilizar apropiadamente PEGs comercializados o conocidos (por ejemplo, <http://www.peg-drug.com/peg-product/branched.html>). Los ejemplos específicos del PEG a aplicar al aptámero de la presente invención incluyen PEG de tipo GS de 2 ramificaciones que tiene un peso molecular de 40000 (SUNBRIGHT GL2-400GS2 fabricado por NOF CORPORATION), PEG de tipo TS de 2 ramificaciones que tiene un peso molecular de 40000 (SUNBRIGHT GL2-400TS fabricado por NOF CORPORATION), PEG de tipo TS de 4 ramificaciones que tiene un

peso molecular de 40000 (SUNBRIGHT GL4-400TS fabricado por NOF CORPORATION), PEG de tipo TS de 2 ramificaciones que tiene un peso molecular de 80000 (SUNBRIGHT GL2 -800TS fabricado por NOF CORPORATION), PEG de tipo TS de 4 ramificaciones que tiene un peso molecular de 80000 (SUNBRIGHT GL4-800TS fabricado por NOF CORPORATION) y similares.

- 5 En este caso, en el aptámero de la presente invención, el PEG se puede añadir directamente al extremo. Un enlazador que tiene un grupo que se puede unir a PEG y similares se puede añadir al extremo del mismo, y se puede añadir PEG al aptámero de la presente invención a través del enlazador.

10 El enlazador para el PEG y el aptámero de la presente invención no está particularmente limitado, y el número de cadenas de carbono, grupo funcional y similares se pueden seleccionar apropiadamente según el lugar de unión, el tipo de PEG y similares. Los ejemplos de dicho enlazador incluyen un enlazador que tiene un grupo amino. Específicamente, cuando se añade al extremo 5', se puede mencionar el ssH Linker (SAFC) o DMS (O) MT-AMINO-MODIFIER (GLEN RESEARCH), y cuando se agrega al extremo 3', se puede mencionar el TFA Amino C-6 1caa CPG (ChemGenes) y similares. Cuando se selecciona este enlazador, por ejemplo, se añade un grupo activo de N-hidroxisuccinimida al PEG, y se hace reaccionar con un grupo amino en el lado del enlazador, por lo que el
15 aptámero de la presente invención se puede unir al PEG a través del enlazador.

Como PEG y enlazador, se pueden utilizar productos comercialmente disponibles. Las condiciones de reacción y similares relacionadas con la unión de PEG, un enlazador y el aptámero de la presente invención pueden ser apropiadamente determinadas por los expertos en la técnica.

20 El aptámero de la presente invención puede sintetizarse químicamente como se divulga en este documento y por un método conocido per se en la técnica. Un aptámero se une a la sustancia diana en una amplia variedad de modos de unión, tales como enlaces iónicos basados en la carga negativa del grupo fosfato, enlaces hidrófobos y enlaces de hidrógeno basados en la ribosa y enlaces de hidrógeno e interacción de apilamiento basada en las bases de ácidos nucleicos. En particular, los enlaces iónicos basados en la carga negativa del grupo fosfato, que están presentes en el mismo número que el número de nucleótidos constituyentes, son fuertes y se unen a la carga
25 positiva de la lisina y arginina presentes en la superficie de la proteína. Por esta razón, las bases de ácido nucleico que no están implicadas en la unión directa a la sustancia diana pueden ser sustituidas. En particular, debido a que la sección de la estructura de tallo ya ha formado pares de bases y se enfrenta al interior de la estructura de doble hélice, es poco probable que las bases de ácido nucleico se unan directamente a la sustancia diana. Por lo tanto, incluso cuando un par de bases se sustituye por otro par de bases, la actividad del aptámero a menudo no disminuye. En estructuras en donde no se forman pares de bases, tales como estructuras de bucle, siempre que la base de ácido nucleico no esté implicada en la unión directa a la molécula diana, es posible la sustitución de bases. Con respecto a las modificaciones de la posición 2' de la ribosa, el grupo funcional en la posición 2' de la ribosa interactúa con poca frecuencia directamente con la molécula diana, pero en muchos casos no es relevante y puede sustituirse con otra molécula modificada. Por lo tanto, en un aptámero, a menos que el grupo funcional implicado en
30 la unión directa a la molécula diana esté sustituido o eliminado, a menudo se retiene su actividad. También es importante que la estructura tridimensional general no cambie sustancialmente.

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

45 Los aptámeros obtenidos por SELEX son ácidos nucleicos que muestran una alta afinidad por la sustancia diana, pero esto no significa que se unan a un sitio activo de la sustancia diana. Por lo tanto, los aptámeros obtenidos por SELEX no actúan necesariamente sobre la función de la sustancia diana. El NGF es una proteína básica, y se cree que es probable que permita que los ácidos nucleicos se unan a ella de forma no específica. Un aptámero que no se une a un lugar activo no influye en la actividad de la sustancia diana.

50 Sobre la base de un aptámero activo seleccionado de este modo, se puede realizar SELEX basándose en la secuencia del aptámero obtenido para adquirir un aptámero que posea una actividad mayor. Específicamente, se realiza nuevamente SELEX después de preparar una plantilla en donde un aptámero con una secuencia determinada se aleatoriza parcialmente o se dopa una plantilla con aproximadamente de 10 a 30% de secuencias aleatorias.

55 Un aptámero obtenido por SELEX tiene una longitud de aproximadamente 80 nucleótidos, y esto es difícil de preparar como un medicamento tal como es. Por lo tanto, es necesario repetir los esfuerzos de prueba y error para acortar el aptámero a una longitud de aproximadamente 60 nucleótidos o menos, lo que permite la síntesis química fácil, aproximadamente 50 nucleótidos o menos, o 45 nucleótidos o menos. Dependiendo del diseño del cebador

para un aptámero obtenido por SELEX, la facilidad de la operación de minimización posterior cambia. A menos que el cebador se haya diseñado con éxito, el desarrollo posterior será imposible incluso si SELEX selecciona un aptámero con actividad.

5 Los aptámeros se alteran fácilmente ya que permiten la síntesis química. Para los aptámeros, al predecir la estructura secundaria usando el programa MFOLD, o al predecir la estructura estérica mediante análisis de rayos X o análisis de RMN, es posible predecir en cierta medida qué nucleótido puede ser sustituido o eliminado, y dónde insertar un nuevo nucleótido. Un aptámero predicho con la nueva secuencia puede sintetizarse químicamente fácilmente, y puede determinarse si el aptámero retiene o no la actividad usando un sistema de ensayo existente.

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

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

15 Como se indicó 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 (o sea, una secuencia correspondiente a una porción seleccionada entre sección de tallo, sección de bucle interno, sección de bucle de horquilla y sección de cadena única: en lo sucesivo, abreviada como secuencia fija según se requiera).

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

Secuencia de cebador (i)

- (N) a-secuencia fija-(N) b-

Secuencia de cebador (ii)

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

El aptámero de la presente invención es preferiblemente un aptámero que se une a NGF, contiene característicamente la secuencia mostrada por SEQ ID NO: 82, y tiene una longitud de nucleótidos de no más de 50.

35 La secuencia mostrada por SEQ ID NO: 82 es una región importante para el aptámero de la presente invención para funcionar como el aptámero de la presente invención tal como en la unión a NGF y en la inhibición de la actividad de NGF, particularmente la actividad de crecimiento de la neurita, actividad de proliferación celular y similares. Incluso cuando se añade una nueva secuencia a ambos extremos de la secuencia, la función del aptámero de la presente invención no se ve afectada. La secuencia puede estar sujeta a la modificación del residuo de azúcar antes mencionado, la alteración de la base de ácido nucleico y el grupo fosfato, y similares.

40 Por lo tanto, los ejemplos específicos preferidos del aptámero de la presente invención incluyen aptámeros que comprenden la secuencia mostrada por SEQ ID NO: 82, que tienen una longitud de nucleótidos de no más de 50, y que se unen a NGF, que son

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

(ii) un aptámero en donde PEG, un aminoácido, péptido, dT invertido, miristoilo, litocólico-oleilo, docosanilo, lauroilo, estearoilo, palmitoilo, oleilo, linoleoilo, otros lípidos, esteroides, colesterol, cafeína, vitamina, colorante, una sustancia fluorescente, un agente anticancerígeno, una toxina, una enzima, una sustancia radioactiva o biotina se añade al extremo;

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

y similares.

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

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

El aptámero y el complejo pueden tener actividad para inhibir la función de NGF mediante la unión a NGF e inhibir la unión de NGF y un receptor de NGF. Como se mencionó anteriormente, NGF está profundamente involucrado en el dolor y la inflamación. Por lo tanto, el aptámero y el complejo son útiles como medicamentos para la profilaxis o el tratamiento de enfermedades que acompañan al dolor o la inflamación (agente contra el dolor, agente antiinflamatorio, etc.).

En este documento, los ejemplos del dolor incluyen dolor nociceptivo (dolor muscular, dolor de espalda, dolor de las extremidades superiores, la lesión de latigazo, artralgia, osteoartritis, gota, artritis reumatoide, dolor de cabeza, dolor de cabeza de migraña, dolor de cabeza catatónico, cefalea en racimos, cefalea secundaria, dolor orofacial, dolor de muelas, causalgia después de la extracción dental, dolor de dientes fantasma, dolor de órganos, dolor cardíaco, dolor abdominal, dolor intermenstrual, dismenorrea, dolor de parto, nefralgia, ureteralgia, ostalgia y similares), dolor inflamatorio, dolor neuropático (neuropatía diabética, neuropatía tóxica, dolor postoperatorio, dolor fantasma de un miembro, dolor en el muñón, distrofia simpática refleja, causalgia, dolor postherpético, neuralgia del trigémino, dolor central), dolor carcinomatoso (dolor debido a la infiltración del cáncer en el órgano visceral, dolor causado por obstrucción de los vasos sanguíneos debido a la infiltración de los vasos sanguíneos de tejido canceroso, dolor de metástasis en los huesos, dolor asociado con metástasis intracerebral, dolor causado por la infiltración del nervio periférico en el tejido canceroso), dolor de fibromialgia y similares.

Mientras que la enfermedad asociada con la inflamación en este documento no está particularmente limitada, pueden mencionarse el lupus eritematoso sistémico, esclerosis múltiple, psoriasis, osteoartritis, artritis reumatoide, cistitis intersticial, asma y similares.

Mientras que el cáncer mencionado anteriormente no está particularmente limitado, pueden mencionarse el cáncer de esófago, cáncer de tiroides, cáncer de la vejiga urinaria, cáncer colorrectal, cáncer gástrico, cáncer pancreático, cáncer torácico, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de mama, neuroblastoma, glioblastoma, cáncer uterino, cáncer cervical, cáncer de ovario, tumor de Wilms, cáncer de próstata y similares.

Cuando NGF se une a su receptor, TrkA, activa la fosforilación de la tirosina de TrkA y Ras-MAPK, PLC- γ y PI3K y similares, corriente abajo de TrkA, y exhibe acciones fisiológicas tales como la supervivencia y la diferenciación de las células nerviosas. Por otro lado, induce la muerte celular en la vía de la señal a través del receptor p75. Por lo tanto, el aptámero y el complejo pueden usarse como medicamentos, agentes de diagnóstico, fármacos de prueba o reactivos para enfermedades relacionadas con la activación de estas vías de transducción de señales. Los ejemplos de las enfermedades relacionadas con la activación de estas vías de transducción de señales incluyen el algia, enfermedad inflamatoria y los cánceres mencionados anteriormente.

Cuando el aptámero y el complejo se usan como medicamentos, agentes de diagnóstico, fármacos de ensayo,

reactivos y similares, el sujeto de administración de los mismos no está particularmente limitado y, por ejemplo, pueden mencionarse primates (por ejemplo, seres humanos, monos), roedores (por ejemplo, el ratón, rata, conejillo de Indias), y animales de compañía, animales domésticos y animales de trabajo (por ejemplo, perros, gatos, caballos, bovinos, caprinos, ovinos, porcinos).

5 El aptámero y el complejo son capaces de unirse específicamente a NGF. Por lo tanto, el aptámero y el complejo son útiles como sondas para la detección de NGF. Las sondas son útiles en la obtención de imágenes in vivo de NGF, mediciones de concentraciones en sangre, tinción de tejidos, ELISA y similares. Las sondas también son útiles como agentes de diagnóstico, fármacos de prueba, reactivos y similares para enfermedades que implican a NGF (enfermedades acompañadas de dolor o inflamación, y similares).

10 En función de su unión específica a NGF, el aptámero y el complejo se pueden usar como ligandos para la separación y purificación de NGF.

Además, el aptámero y el complejo se pueden usar como fármacos de prueba para examinar la afección mental del romance y similares, o medicamentos, reguladores, potenciadores o mitigadores para controlar la afección mental.

El aptámero y el complejo se pueden usar como vehículos de administración de fármacos.

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

20
25

Las preparaciones adecuadas para administración oral son una solución preparada disolviendo una cantidad eficaz de ligando en un diluyente tal como agua, solución salina fisiológica o jugo 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 ingrediente activo en un dispersante apropiado; una emulsión preparada dispersando y emulsionando una solución de una cantidad eficaz de ingrediente activo en un dispersante apropiado, y similares.

30

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

35
40

Como preparaciones adecuadas para administración parenteral (por ejemplo, administración intravenosa, administración subcutánea, administración intramuscular, administración tópica, administración intraperitoneal, administración intranasal, administración pulmonar y similares), se encuentran líquidos inyectables isotónicos estériles acuosos y no acuosos, que pueden comprender un antioxidante, una solución tampón, un agente bacteriostático, un agente isotonzante y similares. También se pueden mencionar suspensiones estériles acuosas y no acuosas, que pueden comprender un agente de suspensión, un espesante, un estabilizador, un antiséptico y similares. La preparación se puede incluir en un recipiente tal como una ampolla o un vial en un volumen de dosificación unitaria o en varias dosis divididas. Un ingrediente activo y un vehículo farmacéuticamente aceptable también se pueden liofilizar y almacenar en un estado que puede disolverse o suspenderse en un vehículo estéril apropiado justo antes del uso. Las preparaciones de liberación sostenida también son preparaciones adecuadas. Las preparaciones de liberación sostenida incluyen la liberación sostenida de vehículos o contenedores incrustados en el cuerpo, tales como huesos artificiales, esponjas biodegradables o no degradables, bolsas, bombas de fármacos, bombas de presión osmótica y similares. Los dispositivos para administración continua o intermitente, sistémica o tópica desde el exterior del cuerpo también se incluyen en el alcance de las preparaciones de liberación sostenida. Las bases biodegradables incluyen liposomas, liposomas catiónicos, ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA), aterocolágeno, gelatina, hidroxiapatita, polisacárido sizofirano. Además de las inyecciones líquidas y preparaciones de liberación sostenida, los inhaladores y ungüentos también son aceptables. En el caso de un inhalante, un ingrediente activo en un estado liofilizado se microniza y se administra por inhalación usando un

45
50
55

dispositivo de inhalación apropiado. Se puede formular un inhalante según sea apropiado con un tensioactivo, aceite, condimento, ciclodextrina o derivado del mismo usados convencionalmente y similares según se requiera.

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

Se puede producir un inhalante según un método convencional. Específicamente, se puede producir un inhalante pulverizando o licuando el aptámero y el complejo descritos anteriormente, mezclándolos en un propulsor y/o vehículo de inhalación, y llenándolos en un recipiente de inhalación apropiado. Cuando el aptámero y el complejo descritos anteriormente son un polvo, se puede usar un inhalador de polvo mecánico ordinario; en el caso de un líquido, se puede usar un inhalador tal como un nebulizador. Aquí, como propulsor, uno convencionalmente conocido puede usarse ampliamente; pueden mencionarse compuestos de la serie clorofluorocarbono tales como clorofluorocarbono-11, clorofluorocarbono-12, clorofluorocarbono-21, clorofluorocarbono-22, clorofluorocarbono-113, clorofluorocarbono-114, clorofluorocarbono-123, clorofluorocarbono-142c, clorofluorocarbono-134a, clorofluorocarbono-227, clorofluorocarbono-C318, y 1,1,1,2-tetrafluoroetano, hidrocarburos tales como propano, isobutano y n-butano, éteres tales como éter dietílico, gases comprimidos tales como gas nitrógeno y gas dióxido de carbono y similares.

La dosificación del medicamento de la presente invención varía dependiendo del tipo y de la actividad de ingrediente activo, la gravedad de la enfermedad, las especies animales que son sujeto de administración, la tolerancia al fármaco del sujeto de administración, el peso corporal, la edad y similares, y la dosis habitual, basada en la cantidad de ingrediente activo por día para un adulto, puede ser de aproximadamente 0,0001 a aproximadamente 100 mg/kg, por ejemplo, aproximadamente de 0,0001 a aproximadamente 10 mg/kg, o de aproximadamente 0,005 a aproximadamente 1 mg/kg.

La presente divulgación también proporciona un portador en fase sólida que tiene el aptámero y el complejo inmovilizado sobre el mismo. Como ejemplos del portador de fase sólida, se pueden mencionar un sustrato, una resina, una placa (por ejemplo, placa de múltiples pocillos), un filtro, un cartucho, una columna y un material poroso. El sustrato puede ser uno usado en chips de ADN, chips de proteínas y similares; por ejemplo, se pueden mencionar sustratos de níquel-PTFE (politetrafluoroetileno), sustratos de vidrio, sustratos de apatita, sustratos de silicona, sustratos de alúmina y similares, y sustratos preparados recubriendo estos sustratos con un polímero y similares. Como ejemplos de la resina, pueden mencionarse partículas de agarosa, partículas de sílice, un copolímero de acrilamida y N,N'-metilbisacrilamida, partículas de divinilbenceno reticulado con poliestireno, partículas de dextrano reticulado con epíclorhidrina, fibra de celulosa, polímeros reticulados de arildextrano y N,N'-metilbisacrilamida, polímeros sintéticos monodispersos, polímeros hidrófilos monodispersos, Sepharose, Toyopearl y similares, y también se incluyen las resinas preparadas uniendo varios grupos funcionales a estas resinas. El portador de fase sólida puede ser útil en, por ejemplo, la purificación, detección y cuantificación de NGF.

El aptámero y el complejo pueden inmovilizarse sobre un portador de fase sólida por un método conocido per se. Por ejemplo, puede mencionarse un método que introduce una sustancia de afinidad (por ejemplo, las descritas anteriormente) o un grupo funcional predeterminado en el aptámero o el complejo, y luego inmoviliza el aptámero y el complejo en un portador de fase sólida a través de la sustancia de afinidad o grupo funcional predeterminado. La presente divulgación también proporciona dichos métodos. El grupo funcional predeterminado puede ser un grupo funcional que puede someterse a una reacción de acoplamiento; por ejemplo, se pueden mencionar un grupo amino, un grupo tiol, un grupo hidroxilo y un grupo carboxi. También se describe en este documento un aptámero que tiene dicho grupo funcional introducido dentro de él.

La presente divulgación también proporciona un método de purificación y concentración de NGF. En particular, la presente divulgación hace posible separar el NGF de las proteínas de otras proteínas familiares. El método de purificación y concentración de la presente divulgación puede comprender adsorber el NGF al portador en fase sólida de la presente divulgación y eluir el NGF adsorbido con un eluyente. La adsorción de NGF al portador en fase sólida de la presente divulgación se puede lograr mediante un método conocido per se. Por ejemplo, una muestra que contiene NGF (por ejemplo un cultivo celular o bacteriano o un sobrenadante de cultivo, sangre) se introduce en

el portador en fase sólida de la presente divulgación o una composición que contiene el mismo. El NGF puede eluirse usando un eluyente tal como una solución neutra. No hay limitación en el eluyente neutro, que puede tener un pH de, por ejemplo, aproximadamente 6 a aproximadamente 9, aproximadamente 6,5 a aproximadamente 8,5, o aproximadamente 7 a aproximadamente 8. La solución neutra también puede comprender, por ejemplo, urea, un agente quelante (por ejemplo, EDTA), una sal de potasio (por ejemplo, KCl), una sal de magnesio (por ejemplo, MgCl₂), un tensioactivo (por ejemplo, Tween 20, Triton, NP40), y glicerina. El método de purificación y concentración de la presente divulgación puede comprender además lavar el portador en fase sólida usando una solución de lavado después de la adsorción de NGF. 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 tales como Tween 20, sales tales como NaCl y similares. El método de purificación y concentración de la presente divulgación puede comprender adicionalmente calentar el portador en fase sólida. Este paso permite la regeneración y la esterilización del portador en fase sólida.

La presente divulgación también proporciona un método para detectar y cuantificar NGF. En particular, la presente divulgación hace posible detectar y cuantificar NGF por separado de las proteínas de otras proteínas familiares. El método de detección y cuantificación de la presente divulgación puede comprender medir NGF utilizando el aptámero de la presente invención (por ejemplo, mediante el uso del complejo y el portador en fase sólida de la presente invención). El método para detectar y cuantificar NGF puede realizarse de la misma manera que un método inmunológico, excepto que se usa el aptámero de la presente invención en lugar de un anticuerpo. Por lo tanto, usando el aptámero de la presente invención como sonda en lugar de un anticuerpo, se puede realizar la detección y cuantificación de la misma manera que tales métodos como el ensayo de inmunoenlace (EIA) (por ejemplo, ELISA competitivo directo, ELISA competitivo indirecto, ELISA tipo sándwich), radioinmunoensayo (RIA), inmunoensayo fluorescente (FIA), técnica de transferencia de Western, método de tinción inmunohistoquímica y método de clasificación celular. El aptámero de la presente invención también puede usarse como sonda molecular para PET y similares. Estos métodos pueden ser útiles, por ejemplo, para medir el contenido de NGF en organismos vivos o muestras biológicas, y para diagnosticar una enfermedad asociada con NGF.

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

Ejemplos

Ejemplo 1: producción del aptámero - 1 de NGF

Se prepararon aptámeros de ARN que se unían específicamente a NGF usando el método SELEX. El SELEX se realizó haciendo referencia al método de Ellington et al. (Ellington y Szostak, *Nature* 346, 818-822, 1990) y el método de Tuerk et al. (Tuerk y Gold, *Science* 249, 505-510, 1990). Se usó NGF humano (fabricado por R & D Systems) como sustancia diana.

El ARN utilizado en la primera ronda (40N) se obtuvo transcribiendo un ADN sintetizado químicamente usando el kit de transcripción DuraScribe™ T7 (fabricado por Epicentre). De los NTPs contenidos en el kit, 2'-OH ATP fue reemplazado con 2'-desoxiadenosina 5'-trifosfato (2'-H ATP o dATP, fabricado por GE Healthcare) y se utilizaron otros sustratos contenidos en el kit. El ARN obtenido por este método tiene la posición 2' de la ribosa del nucleótido de pirimidina fluorada, y G (nucleótido de purina) es de tipo ARN, y A es de tipo ADN. El ADN de 83 nucleótidos que se muestra a continuación, que tiene una secuencia de cebador en cada extremo de una secuencia aleatoria de 40 nucleótidos se utilizó como plantilla de ADN. La plantilla de ADN y los cebadores se prepararon por síntesis química.

Plantilla de ADN 1:

5'-gaggatccatgtatgcgcacata-40n-ctctggtcgaagttctccc-3' (SEQ ID NO: 118)

cebador Fwd1:

5'-cggaattctaatacgcactatagggagaactcgaccagaag-3' (SEQ ID NO: 119)

cebador Rev1:

5'-gaggatccatgtatgcgcacata-3' (SEQ ID NO: 120)

En la secuencia mencionada anteriormente, n representa cualquiera de a, g, c y t. El cebador Fwd1 comprende una secuencia promotora de ARN polimerasa T7. La variación del grupo de ARN utilizado en la primera ronda fue teóricamente de 10¹⁴.

Después de 10 rondas de SELEX, el producto de PCR se clonó en un vector pGEM-T Easy (fabricado por Promega), que se usó para transformar la cepa DH5α de *Escherichia coli* (fabricada por Toyobo). El plásmido se extrajo de una sola colonia y las secuencias de bases se determinaron mediante un secuenciador de ADN (ABI PRISM3100, fabricado por ABI). Se examinaron 48 clones y se pudieron secuenciar 45 secuencias. Entre ellos había 7 tipos de las mismas 2 secuencias, y las 31 secuencias restantes eran secuencias únicas. Se añadieron 3 rondas de SELEX más y se examinó la secuencia. Como resultado, se observó una mayor convergencia.

Se evaluaron las secuencias que mostraron la convergencia en 10 y 13 rondas y varias secuencias únicas en cuanto a la actividad de unión a NGF mediante un método de resonancia de plasmón de superficie.

5 Como aparato de medición, se usó un BIAcore2000 fabricado por BIAcore y, como sensor de chip, se usó CM5 que reacciona con un grupo amino. Se disolvió NGF humano en solución de inmovilización (acetato sódico 10 mM, pH 6) a 25 - 40 µg/ml. Para la reacción de un grupo amino en el lado de la proteína y un grupo carboxi en el lado del chip, se usaron hidrócloruro de etil-3-carbodiimida y N-hidroxisuccinimida. Después de la reacción, se realizó el bloqueo por etanolamina-HCl. La cantidad inmovilizada de NGF se estableció en 3.000 - 4.000 RU. Se preparó un aptámero para el analito a de 0,15 µM - 0,5 µM. Como tampón de ejecución, se usó la solución A. Aquí, la solución A es una solución mixta de cloruro de sodio 145 mM, cloruro de potasio 5,4 mM, cloruro de calcio 1,8 mM, cloruro de magnesio 0,8 mM, Tris 20 mM (pH 7,6), Tween 20 al 0,05%. Como solución de regeneración, se usó una solución mixta de NaCl 1 M y NaOH 50 mM. El NGF se inmovilizó en FC2, y los resultados de FC1 se restaron para proporcionar un sensorgrama final.

15 Se midió la actividad de unión de 34 secuencias para encontrar que todos los ARNs se unen más significativamente al NGF que el 40 N de control. Aquí, 40 N se refiere al grupo de ARN utilizado para la primera ronda, que comprende una secuencia aleatoria de 40 nucleótidos. De lo anterior, se mostró que estos ARNs son aptámeros que se unen al NGF.

Ejemplo 2: aptámero que inhibe la unión de NGF al receptor de NGF

Se determinó si los aptámeros obtenidos en el Ejemplo 1 inhibían la unión de NGF y un receptor de NGF (TrkA y p75) usando el método de resonancia de plasmón de superficie.

20 Como se indica en el protocolo de BIAcore, se inmovilizó la proteína A (21181, PIERCE) en un sensor de chip CM5. Se inmovilizaron aproximadamente 700 a 1200 RU de TrkA humano fusionado con la porción Fc de IgG (175-TK, R & D Systems) o P75 humano (367-NR, R & D Systems). Como analito, se inyectó una mezcla de NGF (0,1 µM) y cada aptámero (0,3 µM) después de dejarla en reposo durante 30 minutos. Si el aptámero inhibe la unión de NGF y TrkA o p75, no se espera que la señal en el sensorgrama aumente; si el aptámero no inhibe la unión, se formará un complejo triple y se espera que la señal aumente. Cuando el NGF se une más fuertemente a un receptor que un aptámero, el aptámero se puede eliminar y el NGF se puede unir al receptor. Antes de comenzar el experimento de inhibición, se confirmó la unión de TrkA o p75 y NGF.

30 Se midió la actividad inhibidora de 34 secuencias para encontrar que todos los aptámeros inhibían la unión de NGF y TrkA o p75. Particularmente, los aptámeros mostrados por las SEQ ID NOs: 1, 2, 3, 4, 5, 7 mostraron una fuerte actividad inhibidora. De lo anterior, se mostró que estos ARNs son aptámeros que inhiben la unión del receptor de NGF y NGF.

Ejemplo 3: actividad inhibidora del crecimiento de la neurita del aptámero

Se evaluó la actividad inhibidora del crecimiento de la neurita del aptámero obtenido en el Ejemplo 1 utilizando células Neuroscreen-1, que son un subclón de las células PC-12.

35 Las células (2500 células por pocillo) se cultivaron durante un día en un medio RPMI-1640 que contenía un 2,5% de suero de caballo y un 1,25% de suero bovino fetal en una placa de 96 pocillos de fondo plano recubierta con colágeno de tipo IV. Se agregó una solución mixta de NGF humano (concentración final 0,38 nM o 1,14 nM) y un aptámero (concentración final de 500-0,01 nM), que se habían hecho reaccionar anteriormente en un medio RPMI-1640 libre de suero a temperatura ambiente o 37° C durante 30 minutos a 1 hora. Dos días más tarde, el citoplasma y los núcleos se tiñeron usando el kit Cellomics Neurite Outgrowth (fabricado por Thermo Scientific), y se midió la longitud de neurita por célula mediante Cellomics ArrayScan VTI (fabricado por Thermo Scientific). Con la longitud de neurita por célula obtenida mediante la adición de NGF solo como actividad inhibidora 0%, y la de la célula obtenida por cultivo libre de NGF durante 2 días como actividad inhibidora 100%, la actividad inhibidora del aptámero se calculó a partir de la longitud de neurita por célula obtenida cultivando con la adición de NGF y el aptámero en la mezcla.

Se midió la actividad inhibidora de los 34 tipos de aptámeros obtenidos en el Ejemplo 1 para encontrar que los aptámeros mostrados por las SEQ ID NOs: 1 - 8 inhibían fuertemente el crecimiento de neuritas cuando se añadía 10 nM de los mismos. Otros aptámeros no mostraron inhibición notable a 10 nM.

50 Las secuencias de nucleótidos realmente obtenidas que corresponden a cada SEQ ID NO se muestran a continuación. Las letras mayúsculas muestran el ARN, las letras minúsculas muestran el ADN, los paréntesis en los nucleótidos muestran la modificación en la posición 2' y F es un átomo de flúor (en lo sucesivo, lo mismo).

SEQ ID NO: 1:

GGGaGaaC(F)U(F)U(F)C(F)GaC(F)C(F)aGaaGU(F)U(F)GaC(F)GaC(F)C(F)a
aC(F)U(F)C(F)GU(F)C(F)U(F)C(F)U(F)U(F)aU(F)GGaU(F)U(F)U(F)aC(F)
GU(F)GaaC(F)C(F)C(F)GU(F)aU(F)GU(F)GC(F)GC(F)aU(F)aC(F)aU(F)GGa
U(F)C(F)C(F)U(F)C(F)

SEQ ID NO: 2:

GGGaGaaC(F)U(F)U(F)C(F)GaC(F)C(F)aGaaGU(F)C(F)C(F)aaaC(F)GGGaC(
F)U(F)U(F)U(F)aU(F)aC(F)C(F)U(F)C(F)U(F)GaGU(F)C(F)GC(F)C(F)U(F)
)aC(F)GC(F)U(F)C(F)C(F)U(F)aU(F)GU(F)GC(F)GC(F)aU(F)aC(F)aU(F)G
GaU(F)C(F)C(F)U(F)C(F)

5 SEQ ID NO: 3:

GGGaGaaC(F)U(F)U(F)C(F)GaC(F)C(F)aGaaGU(F)U(F)GGC(F)aC(F)aU(F)C
(F)C(F)U(F)GC(F)U(F)GC(F)GU(F)aGU(F)U(F)U(F)C(F)C(F)GU(F)C(F)U(
F)C(F)C(F)GU(F)GGC(F)U(F)GU(F)U(F)aU(F)GU(F)GC(F)GC(F)aU(F)aC(F)
)aU(F)GGaU(F)C(F)C(F)U(F)C(F)

SEQ ID NO: 4:

GGGaGaaC(F)U(F)U(F)C(F)GaC(F)C(F)aGaaGU(F)aC(F)GU(F)U(F)aGU(F)a
C(F)GU(F)U(F)U(F)GC(F)aU(F)aU(F)GU(F)aC(F)aaC(F)C(F)U(F)U(F)GC(
F)aU(F)aC(F)GaU(F)aC(F)GU(F)aGaU(F)U(F)aU(F)GU(F)GC(F)GC(F)aU(F)
)aC(F)aU(F)GGaU(F)C(F)C(F)U(F)C(F)

SEQ ID NO: 5:

GGGaGaaC(F)U(F)U(F)C(F)GaC(F)C(F)aGaaGU(F)U(F)aGaaGaGGaC(F)U(F)
aGU(F)U(F)GC(F)U(F)aaU(F)GC(F)C(F)C(F)U(F)GGU(F)U(F)C(F)GU(F)C(
10 F)GC(F)U(F)aU(F)aU(F)GU(F)GC(F)GC(F)aU(F)aC(F)aU(F)GGaU(F)C(F)C(F)U(F)C(F)

SEQ ID NO: 6:

GGGaGaaC(F)U(F)U(F)C(F)GaC(F)C(F)aGaaGU(F)GC(F)aaU(F)aC(F)U(F)U
(F)U(F)C(F)GC(F)GGC(F)aU(F)aU(F)GU(F)GC(F)aaaC(F)C(F)U(F)U(F)GC
(F)C(F)aC(F)GaC(F)U(F)aU(F)GU(F)GC(F)GC(F)aU(F)aC(F)aU(F)GGaU(F
)C(F)C(F)U(F)C(F)

SEQ ID NO: 7:

GGGaGaaC(F)U(F)U(F)C(F)GaC(F)C(F)aGaaGaC(F)GC(F)aC(F)C(F)U(F)C(
F)U(F)U(F)aU(F)C(F)aC(F)aC(F)aU(F)GC(F)GU(F)C(F)aGC(F)C(F)U(F)U
(F)GU(F)GaU(F)aC(F)U(F)aU(F)GU(F)GC(F)GC(F)aU(F)aC(F)aU(F)GGaU(
F)C(F)C(F)U(F)C(F)

15

SEQ ID NO: 8:

GGGaGaaC (F) U (F) U (F) C (F) GaC (F) C (F) aGaaGaU (F) C (F) C (F) aC (F) U (F) GGU
 (F) aC (F) U (F) aC (F) GU (F) GaC (F) C (F) C (F) C (F) GC (F) aU (F) aGGC (F) aaU (F)
 C (F) C (F) U (F) GC (F) U (F) U (F) aU (F) GU (F) GC (F) GC (F) aU (F) aC (F) aU (F) GGA
 U (F) C (F) C (F) U (F) C (F)

Ejemplo 4: acortamiento de aptámeros

5 Los aptámeros mostrados por las SEQ ID NOs: 3 y 6 se sometieron a acortamiento. Usando el programa MFOLD
 (Zuker, Nucleic Acids Res. 31, 3406-3415, 2003), se predijo la estructura secundaria del ARN y la cadena se acortó
 mientras se refería a la estructura de la misma. La forma abreviada se obtuvo sintetizando químicamente el ADN de
 la secuencia objeto y transcribiendo la misma utilizando el kit de transcripción DuraScribe T7 (fabricado por
 Epicentre). El producto de transcripción se trató con AADNsa, la proteína se eliminó mediante un tratamiento con
 10 fenol-cloroformo, y el ARN se recogió mediante precipitación con etanol. La pureza del ARN recuperado se confirmó
 mediante electroforesis en poliacrilamida, y la cantidad se confirmó mediante un método de medición de la
 absorbancia. Las secuencias realmente producidas en una forma abreviada son como se describe a continuación.

SEQ ID NO: 9: ARN de 73 nucleótidos que es en una forma alterada del aptámero mostrado por la SEQ ID NO: 3

GGGaGaaC (F) U (F) U (F) C (F) GaC (F) C (F) aGaaGU (F) U (F) GGC (F) aC (F) aU (F) C
 (F) C (F) U (F) GC (F) U (F) GC (F) GU (F) aGU (F) U (F) U (F) C (F) C (F) GU (F) C (F) U (F)
 F) C (F) C (F) GU (F) GGC (F) U (F) GU (F) U (F) aU (F) GU (F) GC (F) GC (F) aU (F) aC (F)
)

SEQ ID NO: 10: ARN de 68 nucleótidos que es una forma alterada del aptámero mostrado por la SEQ ID NO: 3

GGGaGaaC (F) U (F) U (F) C (F) GaC (F) C (F) aGaaGU (F) U (F) GGC (F) aC (F) aU (F) C
 (F) C (F) U (F) GC (F) U (F) GC (F) GU (F) aGU (F) U (F) U (F) C (F) C (F) GU (F) C (F) U (F)
 15 F) C (F) C (F) GU (F) GGC (F) U (F) GU (F) U (F) aU (F) GU (F) GC (F) G

SEQ ID NO: 11: ARN de 46 nucleótidos que es en una forma alterada del aptámero mostrado por la SEQ ID NO: 3

GGGC (F) aC (F) aU (F) C (F) C (F) U (F) GC (F) U (F) GC (F) GU (F) aGU (F) U (F) U (F) C
 (F) C (F) GU (F) C (F) U (F) C (F) C (F) GU (F) GGC (F) U (F) GU (F) U (F) aU (F) GU (F) G
 C (F)

SEQ ID NO: 12: ARN de 40 nucleótidos que es una forma alterada del aptámero mostrado por la SEQ ID NO: 3

GGGU (F) C (F) C (F) U (F) GC (F) U (F) GC (F) GU (F) aGU (F) U (F) U (F) C (F) C (F) GU (F)
 F) C (F) U (F) C (F) C (F) GU (F) GGC (F) U (F) GU (F) U (F) aC (F) C (F) C (F)

20 SEQ ID NO: 13: ARN de 42 nucleótidos que es en una forma alterada del aptámero mostrado por la SEQ ID NO: 3

GGGGU (F) C (F) C (F) U (F) GC (F) U (F) GC (F) GU (F) aGU (F) U (F) U (F) C (F) C (F) GU
 (F) C (F) U (F) C (F) C (F) GU (F) GGC (F) U (F) GU (F) U (F) aC (F) C (F) C (F) C (F)

SEQ ID NO: 121: el ARN es una forma alterada del aptámero mostrado por SEQ ID NO: 11 en donde 1 par de bases
 está eliminada del tallo 2

GGGC (F) aC (F) aU (F) C (F) C (F) U (F) GC (F) GC (F) GU (F) aGU (F) U (F) U (F) C (F) C
 (F) GU (F) C (F) U (F) C (F) C (F) GU (F) GC (F) U (F) GU (F) U (F) aU (F) GU (F) GC (F)

25 SEQ ID NO: 122: ARN que es una forma alterada del aptámero mostrado por SEQ ID NO: 11 en donde 1 par de
 bases está eliminada del tallo 2

GGGC (F) aC (F) aU (F) C (F) C (F) U (F) GC (F) U (F) GC (F) GaGU (F) U (F) U (F) C (F) C
 (F) GU (F) C (F) U (F) C (F) GU (F) GGC (F) U (F) GU (F) U (F) aU (F) GU (F) GC (F)

ES 2 687 154 T3

SEQ ID NO: 123: ARN que es una forma alterada del aptámero mostrado por SEQ ID NO: 11 en donde 1 par de bases está eliminado del tallo 2

GGGC (F) aC (F) aU (F) C (F) C (F) U (F) GU (F) GC (F) GU (F) aGU (F) U (F) U (F) C (F) C
(F) GU (F) C (F) U (F) C (F) C (F) GU (F) GC (F) U (F) GU (F) U (F) aU (F) GU (F) GC (F)

5 SEQ ID NO:124: ARN que es una forma alterada del aptámero mostrado por SEQ ID NO: 11 en donde 1 par de bases está eliminado del tallo 2

GGGC (F) aC (F) aU (F) C (F) C (F) U (F) GC (F) U (F) GGU (F) aGU (F) U (F) U (F) C (F) C
(F) GU (F) C (F) U (F) C (F) C (F) U (F) GGC (F) U (F) GU (F) U (F) aU (F) GU (F) GC (F)

SEQ ID NO: 125: ARN que es una forma alterada del aptámero mostrado por SEQ ID NO: 11 en donde 1 par de bases está eliminada del tallo 2

GGGC (F) aC (F) aU (F) C (F) C (F) U (F) GC (F) U (F) GC (F) U (F) aGU (F) U (F) U (F) C (F)
(F) C (F) GU (F) C (F) U (F) C (F) GU (F) GGC (F) U (F) GU (F) U (F) aU (F) GU (F) GC (F)

10 SEQ ID NO: 126: ARN que es una forma alterada del aptámero mostrado por SEQ ID NO: 11 en donde 1 par de bases está eliminado del tallo 2

GGGC (F) aC (F) aU (F) C (F) C (F) U (F) GC (F) U (F) GC (F) GU (F) GU (F) U (F) U (F) C (F)
(F) C (F) GU (F) C (F) C (F) C (F) GU (F) GGC (F) U (F) GU (F) U (F) aU (F) GU (F) GC (F)

SEQ ID NO: 127: ARN que es una forma alterada del aptámero mostrado por SEQ ID NO: 13 en donde 1 par de bases está eliminado del tallo 2

15 GGGGU (F) C (F) C (F) U (F) C (F) U (F) GC (F) GU (F) aGU (F) U (F) U (F) C (F) C (F) GU (F)
(F) C (F) U (F) C (F) C (F) GU (F) GGU (F) GU (F) U (F) aC (F) C (F) C (F) C (F)

SEQ ID NO: 128: ARN que es una forma alterada del aptámero mostrado por SEQ ID NO: 13 en donde 1 par de bases está eliminado del tallo 2

GGGGU (F) C (F) C (F) U (F) GC (F) U (F) GC (F) GU (F) aU (F) U (F) U (F) C (F) C (F) GU (F)
(F) U (F) C (F) C (F) GU (F) GGC (F) U (F) GU (F) U (F) aC (F) C (F) C (F) C (F)

20 SEQ ID NO: 129: ARN que es una forma alterada del aptámero mostrado por SEQ ID NO: 13 en donde 1 par de bases está eliminado del tallo

GGGGC (F) C (F) U (F) GC (F) U (F) GC (F) GU (F) aGU (F) U (F) U (F) C (F) C (F) GU (F) C
(F) U (F) C (F) C (F) GU (F) GGC (F) U (F) GU (F) U (F) C (F) C (F) C (F) C (F)

SEQ ID NO: 130: ARN que es una forma alterada del aptámero mostrado por SEQ ID NO: 11 en donde un U está eliminado del bucle 2

GGGC (F) aC (F) aU (F) C (F) C (F) U (F) GC (F) U (F) GC (F) GU (F) aGU (F) U (F) C (F) C
(F) GU (F) C (F) U (F) C (F) C (F) GU (F) GGC (F) U (F) GU (F) U (F) aU (F) GU (F) GC (F)

25 SEQ ID NO: 131: ARN que es una forma alterada del aptámero mostrado por SEQ ID NO: 11 en donde dos C's están eliminadas del bucle 2

GGGC (F) aC (F) aU (F) C (F) C (F) U (F) GC (F) U (F) GC (F) GU (F) aGU (F) U (F) U (F) G
U (F) C (F) U (F) C (F) C (F) GU (F) GGC (F) U (F) GU (F) U (F) aU (F) GU (F) GC (F)

SEQ ID NO: 132: ARN que es una forma alterada del aptámero mostrado por SEQ ID NO: 11 en donde una G está eliminada del bucle 2

30 GGGC (F) aC (F) aU (F) C (F) C (F) U (F) GC (F) U (F) GC (F) GU (F) aGU (F) U (F) U (F) C
(F) C (F) U (F) C (F) U (F) C (F) C (F) GU (F) GGC (F) U (F) GU (F) U (F) aU (F) GU (F) GC

(F)

SEQ ID NO: 133: ARN que es una forma alterada del aptámero mostrado por SEQ ID NO: 13 en donde un U está eliminado del bucle 2

GGGGU (F) C (F) C (F) U (F) GC (F) U (F) GC (F) GU (F) aGU (F) U (F) U (F) C (F) C (F) GC (F) U (F) C (F) C (F) GU (F) GGC (F) U (F) GU (F) U (F) aC (F) C (F) C (F) C (F)

5 SEQ ID NO: 134: ARN que es una forma alterada del aptámero mostrado por SEQ ID NO: 11 en donde un U está eliminado del bucle interno 1

GGGC (F) aC (F) aU (F) C (F) C (F) U (F) GC (F) U (F) GC (F) GU (F) aGU (F) U (F) U (F) C (F) C (F) GU (F) C (F) U (F) C (F) C (F) GU (F) GGC (F) U (F) GU (F) aU (F) GU (F) GC (F)

SEQ ID NO: 135: ARN que es una forma alterada del aptámero mostrado por SEQ ID NO: 13 en donde un C está eliminada del bucle interno 1

GGGGU (F) C (F) U (F) GC (F) U (F) GC (F) GU (F) aGU (F) U (F) U (F) C (F) C (F) GU (F) C (F) U (F) C (F) C (F) GU (F) GGC (F) U (F) GU (F) U (F) aC (F) C (F) C (F) C (F)

10 SEQ ID NO: 136: ARN que es una forma alterada del aptámero mostrado por SEQ ID NO: 13 en donde un U está eliminado del bucle interno 1

GGGGU (F) C (F) C (F) GC (F) U (F) GC (F) GU (F) aGU (F) U (F) U (F) C (F) C (F) GU (F) C (F) U (F) C (F) C (F) GU (F) GGC (F) U (F) GU (F) U (F) aC (F) C (F) C (F) C (F)

SEQ ID NO: 137: ARN que es una forma alterada del aptámero mostrado por SEQ ID NO: 13 en donde una C y un U están eliminados del bucle interno 1

15 **GGGGU (F) C (F) U (F) GC (F) U (F) GC (F) GU (F) aGU (F) U (F) U (F) C (F) C (F) GU (F) C (F) U (F) C (F) C (F) GU (F) GGC (F) U (F) GU (F) aC (F) C (F) C (F) C (F)**

SEQ ID NO: 138: ARN que es una forma alterada del aptámero mostrado por SEQ ID NO: 13 en donde una C y una G están eliminadas del bucle interno 1

GGGGU (F) C (F) U (F) GC (F) U (F) GC (F) GU (F) aGU (F) U (F) U (F) C (F) C (F) GU (F) C (F) U (F) C (F) C (F) GU (F) GGC (F) U (F) U (F) U (F) aC (F) C (F) C (F) C (F)

20 SEQ ID NO: 139: ARN que es una forma alterada del aptámero mostrado por SEQ ID NO: 13 en donde dos Us están eliminados del bucle interno 1

GGGGU (F) C (F) C (F) GC (F) U (F) GC (F) GU (F) aGU (F) U (F) U (F) C (F) C (F) GU (F) C (F) U (F) C (F) C (F) GU (F) GGC (F) GU (F) U (F) aC (F) C (F) C (F) C (F)

SEQ ID NO: 140: ARN que es una forma alterada del aptámero mostrado por SEQ ID NO: 13 en donde un U y una G están eliminados del bucle interno 1

GGGGU (F) C (F) C (F) GC (F) U (F) GC (F) GU (F) aGU (F) U (F) U (F) C (F) C (F) GU (F) C (F) U (F) C (F) C (F) GU (F) GGC (F) U (F) U (F) U (F) aC (F) C (F) C (F) C (F)

25 SEQ ID NO: 141: ARN que es una forma alterada del aptámero mostrado por SEQ ID NO: 13 en donde dos Us están eliminados del bucle interno 1

GGGGU (F) C (F) C (F) GC (F) U (F) GC (F) GU (F) aGU (F) U (F) U (F) C (F) C (F) GU (F) C (F) U (F) C (F) C (F) GU (F) GGC (F) U (F) GU (F) aC (F) C (F) C (F) C (F)

SEQ ID NO: 14: aptámero de 78 nucleótidos que es una forma alterada del aptámero mostrado por SEQ ID NO: 6

GGGaGaaC (F) U (F) U (F) C (F) GaC (F) C (F) aGaaGU (F) GC (F) aaU (F) aC (F) U (F) U (F) U (F) C (F) GC (F) GGC (F) aU (F) aU (F) GU (F) GC (F) aaaC (F) C (F) U (F) U (F) GC (F) C (F) aC (F) GaC (F) U (F) aU (F) GU (F) GC (F) GC (F) aU (F) aC (F) aU (F) GGa

SEQ ID NO: 15: aptámero de 73 nucleótidos que es una forma alterada del aptámero mostrado por SEQ ID NO: 6

GGGaGaaC (F) U (F) U (F) C (F) GaC (F) C (F) aGaaGU (F) GC (F) aaU (F) aC (F) U (F) U
(F) U (F) C (F) GC (F) GGC (F) aU (F) aU (F) GU (F) GC (F) aaaC (F) C (F) U (F) U (F) GC
(F) C (F) aC (F) GaC (F) U (F) aU (F) GU (F) GC (F) GC (F) aU (F) aC (F)

SEQ ID NO: 16: aptámero de 63 nucleótidos que es una forma alterada del aptámero mostrado por SEQ ID NO: 6

C (F) GaC (F) C (F) aGaaGU (F) GC (F) aaU (F) aC (F) U (F) U (F) U (F) C (F) GC (F) GGC
(F) aU (F) aU (F) GU (F) GC (F) aaaC (F) C (F) U (F) U (F) GC (F) C (F) aC (F) GaC (F) U
(F) aU (F) GU (F) GC (F) GC (F) aU (F) aC (F)

5 SEQ ID NO: 17: aptámero de 58 nucleótidos que es una forma alterada del aptámero mostrado por SEQ ID NO: 6

aGaaGU (F) GC (F) aaU (F) aC (F) U (F) U (F) U (F) C (F) GC (F) GGC (F) aU (F) aU (F) G
U (F) GC (F) aaaC (F) C (F) U (F) U (F) GC (F) C (F) aC (F) GaC (F) U (F) aU (F) GU (F) G
C (F) GC (F) aU (F) aC (F)

SEQ ID NO: 18: aptámero de 48 nucleótidos que es una forma alterada del aptámero mostrado por SEQ ID NO: 6

U (F) GC (F) aaU (F) aC (F) U (F) U (F) U (F) C (F) GC (F) GGC (F) aU (F) aU (F) GU (F) G
C (F) aaaC (F) C (F) U (F) U (F) GC (F) C (F) aC (F) GaC (F) U (F) aU (F) GU (F) GC (F) G

SEQ ID NO: 19: aptámero de 46 nucleótidos que es una forma alterada del aptámero mostrado por SEQ ID NO: 6

10 GC (F) aaU (F) aC (F) U (F) U (F) U (F) C (F) GC (F) GGC (F) aU (F) aU (F) GU (F) GC (F)
aaaC (F) C (F) U (F) U (F) GC (F) C (F) aC (F) GaC (F) U (F) aU (F) GU (F) GC (F)

SEQ ID NO: 20: aptámero de 50 nucleótidos que es una forma alterada del aptámero mostrado por SEQ ID NO: 6

GU (F) GC (F) aaU (F) aC (F) U (F) U (F) U (F) C (F) GC (F) GGC (F) aU (F) aU (F) GU (F)
GC (F) aaaC (F) C (F) U (F) U (F) GC (F) C (F) aC (F) GaC (F) U (F) aU (F) GU (F) GC (F)
GC (F)

SEQ ID NO: 21: aptámero de 48 nucleótidos que es una forma alterada del aptámero mostrado por SEQ ID NO: 6

GGGaaU (F) aC (F) U (F) U (F) U (F) C (F) GC (F) GGC (F) aU (F) aU (F) GU (F) GC (F) aa
aC (F) C (F) U (F) U (F) GC (F) C (F) aC (F) GaC (F) U (F) aU (F) GU (F) C (F) C (F) C (F)

15 La actividad de unión de estos aptámeros a NGF fue evaluada por el método de resonancia del plasmón superficial de la misma manera como en el Ejemplo 1. Como resultado, se encontró que los ARN mostrados por las SEQ ID Nos: 9-21 se unían más significativamente a NGF que el 40N del control. Por otro lado, la cantidad unida de los ARN mostrados por las SEQ ID NOs: 121-141 marcadamente disminuyó comparados con los aptámeros mostrados por la SEQ ID NO: 11 o 13.

20 La inhibición de la unión de NGF a sus receptores (TrkA y p75) se evaluó mediante el método de resonancia de plasmón superficial de la misma manera que en el Ejemplo 2 para encontrar que los aptámeros mostrados por SEQ ID NOs: 9 - 16 tienen una alta actividad inhibidora.

25 Se examinó la actividad inhibidora de crecimiento de la neurita mediante un método similar al Ejemplo 3 para encontrar que los aptámeros mostrados por las SEQ ID NOs: 9-21 muestran una alta actividad inhibidora a una concentración de 10 nM. Por otro lado, los aptámeros mostrados por las SEQ ID NOs: 127, 128, 131, 133, 135, 141 no mostraron una notable actividad inhibidora a 10 nM.

Ejemplo 5: predicción de la estructura secundaria del aptámero mostrada por SEQ ID NO: 3 y forma abreviada de la misma

30 Se predijo la estructura secundaria de los ARN mostrados por las SEQ ID NOs: 3, 9-13 y SEQ ID NOs: 121-141 utilizando el programa MFOLD. Todos los aptámeros que tienen actividad contenían la estructura secundaria del aptámero mostrada por la SEQ ID NO: 12 (Fig 1). La estructura secundaria se caracterizó por 4 estructuras de tallo

1, el bucle interno 1, el tallo 2 y el bucle 2, desde el extremo 5' (Fig. 2). El tallo 1 consta de 4 pares de bases, el bucle interno 1 consiste en 3 nucleótidos y 4 nucleótidos, el tallo 2 consiste en 9 pares de bases, y el bucle 2 consiste en 7 nucleótidos.

5 Todas las actividades de los ARN mostrados por las SEQ ID NO: 121-128 en las que se elimina 1 par de bases del tallo 2 disminuyeron notablemente. Por lo tanto, se sugirió que el tallo 2 requiere 9 pares de bases.

10 Los aptámeros mostrados por las SEQ ID NOs: 12 y 13 son formas alteradas del aptámero mostrado por SEQ ID NO: 11, en donde el tallo 1 está sustituido por un par de G-C. Los aptámeros mostrados por SEQ ID NOs: 12 y 13 mostraron una actividad inhibidora de crecimiento de la neurita equivalente a la de SEQ ID NO: 11. Por lo tanto, se sugirió que la actividad no está marcadamente influenciada por el par de bases siempre que el tallo 1 sea una estructura de tallo. Por otra parte, la actividad de ARN mostrada por la SEQ ID NO: 129, que es un aptámero mostrado por SEQ ID NO: 13 en donde el par de bases U-a se elimina del tallo 1, disminuye notablemente. Por lo tanto, se encontró que el cuarto par de bases del tallo 1 necesita ser U-a.

Los ARN mostrados por las SEC ID NO: 130-133 en donde un nucleótido se elimina del bucle 2, mostraron todos una actividad marcadamente disminuida. Por lo tanto, se sugirió que el bucle 2 debe constar de 7 nucleótidos.

15 Los ARN mostrados por las SEC ID NO: 134-141 en donde 1 o 2 nucleótidos del bucle interno 1 se eliminaron mostraron una actividad marcadamente disminuida. Por lo tanto, se sugirió que el bucle interno 1 debe consistir en un total de 7 nucleótidos.

La estructura especificada en la Fig. 2 se denominará en lo sucesivo como la estructura secundaria de consenso 1.

Ejemplo 6: producción del aptámero - 2 de NGF

20 Usando un cebador diferente del que se muestra en el Ejemplo 1, se realizó SELEX, y se investigó si se puede obtener un aptámero que tenga una estructura secundaria de consenso 1. La plantilla de ADN y las secuencias de cebador usadas se muestran a continuación.

ADN plantilla 2:

```
5' -
ccagttgttggtgacaatgcaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaagca
gctccacaggtccc (SEQ ID NO: 142)
```

25 cebador Fwd2:

5'-taatacactcactataggaagcctgtggagctgc (SEQ ID NO: 143)

cebador Rev2:

5'-gcattgcaccaacaactgg (SEQ ID NO: 144)

30 En las secuencias mencionadas anteriormente, n representa cualquiera de a, g, c y t. El cebador Fwd2 comprende una secuencia promotora de ARN polimerasa T7. La variación del grupo de ARN utilizado en la primera ronda fue teóricamente de 10^{14} .

35 Se realizó SELEX de la misma manera que en el Ejemplo 1. Después de 10 rondas de SELEX, se examinaron 48 clones y se pudieron secuenciar 46 secuencias. Entre ellas se encontraban 1 secuencia en la que 5 clones eran iguales, 4 secuencias en las que 3 clones eran iguales, y 3 secuencias en las que 2 clones eran iguales, y un total de 8 secuencias mostraron convergencia. Las 23 secuencias restantes fueron secuencias únicas.

Se seleccionaron 8 secuencias que mostraban convergencia, y la actividad de unión a NGF se evaluó mediante el método de resonancia de plasmón superficial. El método de medición fue similar al Ejemplo 1. Como resultado, todas las secuencias se unieron al NGF solo ligeramente.

40 La estructura secundaria de todas las secuencias que incluyen secuencias únicas se predijo utilizando un programa MFOLD para no encontrar ninguna secuencia que contuviera la estructura secundaria de consenso 1.

Ejemplo 7: producción del aptámero - 3 de NGF

45 Se realizó SELEX utilizando un conjunto de ARN que contenía una secuencia mostrada por la SEQ ID NO: 12 dopada con 15% de secuencias aleatorias y agregada con secuencias de cebador, similares a las del Ejemplo 1, a sus dos extremos. El SELEX se realizó casi de la misma manera que en el Ejemplo 1. Las secuencias de la plantilla se muestran a continuación.

plantilla 3:

5' -gaggatccatgtatgcgcacata-
acagccacggagacggaactacgcagcaggatgtgccaa-cttctggtcgaagttctccc-
 3' (SEQ ID NO: 145)

En la secuencia, la secuencia de base subrayada es como se describe a continuación.

a: a (85%), g (5%), c (5%), t (5%)

5 g: a (5%), g (85%), c (5%), t (5%)

c: a (5%), g (5%), c (85%), t (5%)

t: a (5%), g (5%), c (5%), t (85%)

10 Después de completar 4 rondas, se confirmó la secuencia de 48 clones y se encontró que aproximadamente la mitad era una secuencia que contenía la SEQ ID NO: 12 y el resto era una secuencia con mutaciones en varios sitios. Para eliminar la misma secuencia que la SEQ ID NO: 12, se añadió el oligo antisentido de SEQ ID NO: 12 al conjunto de ARN, y se realizó SELEX durante 3 rondas más. La secuencia de oligo antisentido es como se describe a continuación.

5'-agacggaaactacgcagcagga-3' - (SEQ ID NO: 146)

15 Se añadió el oligo antisentido en una cantidad de 10 veces con respecto al conjunto de ARN. Se confirmó la secuencia del ARN obtenido y se encontró que aproximadamente la mitad era una secuencia mostrada por SEQ ID NO: 12 con mutaciones en varios sitios y el resto era una secuencia completamente diferente de la secuencia mostrada por SEQ ID NO: 12.

20 Se seleccionaron un total de 16 secuencias mostradas por SEQ ID NOs: 22-37 de 4 y 7 rondas, y se examinaron la actividad de unión a NGF y la actividad inhibidora de la unión de NGF y el receptor de NGF. La medición fue como se muestra en los Ejemplos 1 y 2 y se usó el método de resonancia de plasmón superficial. Como resultado de la medición, se encontró que todas las secuencias se unen más significativamente al NGF que la 40N de control, e inhiben la unión de NGF y el receptor de NGF. Además, se midió la actividad inhibidora de crecimiento de la neurita mediante un método similar al del Ejemplo 3. Como resultado, todas las secuencias mostraron una alta actividad inhibidora a una concentración de 10 nM. Las secuencias de nucleótidos actualmente obtenidas, que corresponden a cada SEQ ID NO a continuación, se muestran

SEQ ID NO: 22:

GGGaGaaC (F) U (F) U (F) C (F) GaC (F) C (F) aGaaGU (F) U (F) GGC (F) aC (F) aU (F) C
 (F) C (F) U (F) GC (F) U (F) GC (F) GU (F) aGU (F) U (F) U (F) C (F) C (F) GU (F) C (F) U (F)
 (F) U (F) C (F) GU (F) GGC (F) U (F) GU (F) U (F) aU (F) GU (F) GC (F) GC (F) aU (F) aC (F)
) aU (F) GGaU (F) C (F) C (F) U (F) C (F)

SEQ ID NO: 23:

GGGaGaaC (F) U (F) U (F) C (F) GaC (F) C (F) aGaaGU (F) GGC (F) aC (F) aU (F) C (F) C
 (F) U (F) GC (F) U (F) GC (F) GU (F) aGU (F) U (F) U (F) C (F) C (F) GU (F) C (F) U (F) GC
 (F) GU (F) GGC (F) U (F) GU (F) U (F) aU (F) GU (F) GC (F) GC (F) aU (F) aC (F) aU (F) G
 GaU (F) C (F) C (F) U (F) C (F)

30 SEQ ID NO: 24:

GGGaGaaC (F) U (F) U (F) C (F) GaC (F) C (F) aGaaGU (F) U (F) GGC (F) aC (F) aU (F) C
 (F) C (F) U (F) GC (F) U (F) GC (F) GaaGU (F) U (F) U (F) C (F) C (F) GU (F) C (F) U (F) C
 (F) C (F) GU (F) GGC (F) U (F) GU (F) U (F) aU (F) GU (F) GC (F) GC (F) aU (F) aC (F) aU
 (F) GGaU (F) C (F) C (F) U (F) C (F)

SEQ ID NO: 25:

GGGaGaaC (F) U (F) U (F) C (F) GaC (F) C (F) aGaaGU (F) U (F) GGC (F) aC (F) aU (F) C
 (F) C (F) U (F) GC (F) U (F) GC (F) GC (F) aGU (F) U (F) U (F) C (F) C (F) GU (F) C (F) U (F)
 (F) aC (F) GU (F) GGC (F) U (F) GU (F) U (F) aU (F) GU (F) GC (F) GC (F) aU (F) aC (F) aU
 (F) GGaU (F) C (F) C (F) U (F) C (F)

SEQ ID NO: 26:

GGGaGaaC (F) U (F) U (F) C (F) GaC (F) C (F) aGaaGU (F) GGC (F) aC (F) aU (F) C (F) C
 (F) U (F) GC (F) U (F) GC (F) GU (F) aGU (F) U (F) U (F) C (F) C (F) GU (F) C (F) U (F) U (F)
 (F) C (F) GC (F) GGC (F) U (F) GU (F) U (F) aU (F) GU (F) GC (F) GC (F) aU (F) aC (F) aU (F)
 (F) GGaU (F) C (F) C (F) U (F) C (F)

5 SEQ ID NO: 27:

GGGaGaaC (F) U (F) U (F) C (F) GaC (F) C (F) aGaaGU (F) U (F) GGC (F) aC (F) aU (F) C
 (F) C (F) U (F) GC (F) U (F) GC (F) GC (F) aGU (F) U (F) U (F) C (F) C (F) GU (F) C (F) U (F)
 (F) GC (F) GU (F) GGC (F) U (F) GU (F) U (F) aU (F) GU (F) GC (F) GC (F) aU (F) aC (F) aU
 (F) GGaU (F) C (F) C (F) U (F) C (F)

SEQ ID NO: 28:

GGGaGaaC (F) U (F) U (F) C (F) GaC (F) C (F) aGaaGU (F) U (F) GGC (F) aC (F) aU (F) C
 (F) C (F) U (F) GC (F) U (F) GC (F) GU (F) aGU (F) U (F) U (F) C (F) C (F) aU (F) C (F) U (F)
 (F) GC (F) GU (F) GGC (F) U (F) GU (F) U (F) aU (F) GU (F) GC (F) GC (F) aU (F) aC (F) aU
 (F) GGaU (F) C (F) C (F) U (F) C (F)

10 SEQ ID NO: 29:

GGGaGaaC (F) U (F) U (F) C (F) GaC (F) C (F) aGaaGU (F) U (F) C (F) aC (F) aU (F) C (F)
) C (F) U (F) GC (F) U (F) GC (F) GaaGU (F) U (F) U (F) C (F) C (F) U (F) U (F) C (F) U (F)
 U (F) C (F) GU (F) GGC (F) U (F) GU (F) U (F) aU (F) GU (F) GC (F) GC (F) aU (F) aC (F) a
 U (F) GGaU (F) C (F) C (F) U (F) C (F)

SEQ ID NO: 30:

GGGaGaaC (F) U (F) U (F) C (F) GaC (F) C (F) aGaaGU (F) U (F) GGC (F) aC (F) aU (F) C
 (F) C (F) U (F) GC (F) U (F) GC (F) GaaGGU (F) U (F) C (F) C (F) GU (F) C (F) U (F) U (F)
 C (F) GU (F) GGC (F) U (F) GU (F) aC (F) U (F) aU (F) GU (F) GC (F) GC (F) aU (F) aC (F)
 aU (F) GGaU (F) C (F) C (F) U (F) C (F)

SEQ ID NO: 31:

GGGaGaaC (F) U (F) U (F) C (F) GaC (F) C (F) aGaaGU (F) U (F) GGC (F) aC (F) aU (F) C
 (F) C (F) U (F) GC (F) U (F) GC (F) GC (F) aGU (F) U (F) U (F) C (F) C (F) C (F) U (F) C (F)
) U (F) GC (F) GU (F) GGC (F) U (F) GU (F) U (F) aU (F) GU (F) GC (F) GC (F) aU (F) aC (F)
) aU (F) GGaU (F) C (F) C (F) U (F) C (F)

15

SEQ ID NO: 32:

GGGaGaaC (F) U (F) U (F) C (F) GaC (F) C (F) aGaaGU (F) U (F) GGC (F) aC (F) aU (F) C (F) C (F) U (F) GC (F) U (F) GC (F) GGaGU (F) U (F) U (F) C (F) C (F) U (F) U (F) C (F) U (F) U (F) C (F) GU (F) GGC (F) U (F) GU (F) U (F) aU (F) GU (F) GC (F) GC (F) aU (F) aC (F)) aU (F) GGaU (F) C (F) C (F) U (F) C (F)

SEQ ID NO: 33:

GGGaGaaC (F) U (F) U (F) C (F) GaC (F) C (F) aGaaGU (F) U (F) GGC (F) aC (F) aU (F) C (F) C (F) U (F) GC (F) C (F) GC (F) GU (F) aGU (F) U (F) U (F) C (F) aaU (F) C (F) U (F) U (F) GGU (F) GGC (F) GU (F) GU (F) aU (F) GU (F) GC (F) GC (F) aU (F) aC (F) aU (F) GGaU (F) C (F) C (F) U (F) C (F)

5 SEQ ID NO: 34:

GGGaGaaC (F) U (F) U (F) C (F) GaC (F) C (F) aGaaGU (F) U (F) GGC (F) aC (F) aU (F) C (F) C (F) U (F) GC (F) C (F) GC (F) GU (F) aGU (F) U (F) U (F) C (F) C (F) GU (F) C (F) U (F) GC (F) GU (F) GGC (F) U (F) GU (F) U (F) aU (F) GU (F) GC (F) GC (F) aU (F) aC (F) aU (F) GGaU (F) C (F) C (F) U (F) C (F)

SEQ ID NO: 35:

GGGaGaaC (F) U (F) U (F) C (F) GaC (F) C (F) aGaaGU (F) U (F) GGC (F) aC (F) aU (F) C (F) C (F) U (F) GU (F) U (F) GC (F) GU (F) aGU (F) U (F) U (F) C (F) C (F) U (F) U (F) C (F)) U (F) aC (F) GU (F) GGC (F) U (F) GU (F) U (F) aU (F) GU (F) GC (F) GC (F) aU (F) aC (F)) aU (F) GGaU (F) C (F) C (F) U (F) C (F)

10 SEQ ID NO: 36:

GGGaGaaC (F) U (F) U (F) C (F) GaC (F) C (F) aGaaGGU (F) aC (F) GU (F) U (F) aGU (F) aC (F) GU (F) U (F) U (F) GC (F) aU (F) aU (F) GU (F) aC (F) aaC (F) C (F) U (F) U (F) GC (F) aU (F) aC (F) GaU (F) aC (F) GU (F) aGGU (F) U (F) aU (F) GU (F) GC (F) GC (F) aU (F) aC (F) aU (F) GGaU (F) C (F) C (F) U (F) C (F)

SEQ ID NO: 37:

GGGaGaaC (F) U (F) U (F) C (F) GaC (F) C (F) aGaaGU (F) U (F) GGC (F) aC (F) aU (F) C (F) C (F) U (F) GC (F) U (F) aC (F) GU (F) aGU (F) U (F) U (F) C (F) C (F) U (F) U (F) C (F)) U (F) U (F) C (F) GU (F) GGC (F) U (F) GU (F) U (F) aU (F) GU (F) GC (F) GC (F) aU (F) aC (F) aU (F) GGaU (F) C (F) C (F) U (F) C (F)

15 La estructura secundaria de los aptámeros mostrada por las SEQ ID NOs: 22-37 se predijo utilizando el programa MFOLD para encontrar que todos los aptámeros distintos de los aptámeros mostrados por las SEQ ID NOs: 30, 33, 36 contenían la estructura secundaria de consenso 1. El lado 5' de todas las secuencias de los bucles internos 1 era CCU y el lado 3' era UGUU (Fig. 2). Además, el bucle 2 contenía una secuencia de consenso mostrada por 5'-UUUCCXU-3'. Aquí, X es cualquiera de A, G, C y U. Todos los pares de bases finales del tallo 1 eran U-a. Los pares de bases 1, 5, 6, 8 y 9 del tallo 2 fueron GC, CG, GC, a-U y G-C, respectivamente. El 2º, 4º y 7º contenían algunos
20 pares de bases diferentes.

Ejemplo 8: actividad inhibidora de la proliferación celular del aptámero (ensayo TF-1)

Se evaluaron las actividades inhibidoras de los aptámeros mostrados por SEQ NOs 22 a 37 mediante un ensayo de inhibición de la proliferación usando células TF-1.

Se introdujeron dos genes del receptor de NGF (TrkA humano y p75 humano) en células TF-1 (Número de ATCC: CRL-2003), que es una línea celular eritroleucémica humana, usando un vector de retrovirus para dar células que expresan altamente dos receptores de forma simultánea y estable. Las células se suspendieron en un medio RPMI-1640 que contenía un 20% de suero bovino fetal, y se sembraron en una placa blanca de 96 pocillos de fondo plano a 1000 células (50 µl) por pocillo. A esto se añadió una solución mixta de 50 µl de NGF humano (concentración final de 0,076 nM) y el aptámero (concentración final de 30-0,01 nM), que habían reaccionado previamente a temperatura ambiente durante 30 minutos en un medio RPMI-1640 libre de suero, 3 días después se añadieron 100 µl de reactivo CellTiter-Glo para el ensayo de viabilidad celular luminiscente de CellTiter-Glo (fabricado por Promega) a cada pocillo, la quimioluminiscencia se midió mediante un lector de microplaca y se evaluó el crecimiento de células TF-1 por estimulación con NGF. La cantidad de luminiscencia por pocillo obtenida mediante la adición de NGF solo y cultivo de las células durante 3 días se tomó como actividad inhibidora 0%, y la del pocillo obtenida mediante cultivo sin NGF durante 3 días se tomó como actividad inhibidora 100%, y se calculó la actividad inhibidora del aptámero a partir de la cantidad de luminiscencia por pocillo obtenida cultivando con la adición de NGF y el aptámero en la mezcla. Como resultado, se encontró que todos estos aptámeros muestran una alta actividad inhibidora a una concentración de 10 nM.

Se examinó la actividad inhibidora de los aptámeros mostrados por las SEQ ID NOs: 62 y 68 descritas en el documento de patente internacional WO 2010/035725A1 como comparación. Como resultado, CI_{50} fue 6,1 y 7,5 nM, respectivamente.

Ejemplo 9: acortamiento del aptámero - 2

Los aptámeros mostrados por las SEQ ID NOs: 23, 25, 26, 27, 28, 29, 31, 32, 34 y 35 que mostraron una alta actividad inhibidora se sometieron a acortamiento con referencia a la estructura secundaria de consenso 1. La actividad de unión a NGF se midió mediante el método de resonancia de plasmón superficial de la misma manera que en el Ejemplo 1 para encontrar que todas las formas acortadas se unían fuertemente al NGF. Además, se midió la actividad inhibidora de crecimiento de la neurita y la actividad inhibidora de la proliferación celular TF-1 mediante un método similar al de los Ejemplos 3 y 8 para encontrar una actividad inhibidora fuerte a una concentración de 10 nM. Las secuencias de nucleótidos actualmente obtenidas se muestran a continuación.

SEQ ID NO: 38: (forma acortada de SEQ ID NO: 26)

GGGU (F) C (F) C (F) U (F) GC (F) U (F) GC (F) GU (F) aGU (F) U (F) U (F) C (F) C (F) GU (F) C (F) U (F) U (F) C (F) GC (F) GGC (F) U (F) GU (F) U (F) aC (F) C (F) C (F)

SEQ ID NO: 39: (forma acortada de SEQ ID NO: 27)

GGGU (F) C (F) C (F) U (F) GC (F) U (F) GC (F) GC (F) aGU (F) U (F) U (F) C (F) C (F) GU (F) C (F) U (F) GC (F) GU (F) GGC (F) U (F) GU (F) U (F) aC (F) C (F) C (F)

SEQ ID NO: 40: (forma acortada de SEQ ID NO: 28)

GGGU (F) C (F) C (F) U (F) GC (F) U (F) GC (F) GU (F) aGU (F) U (F) U (F) C (F) C (F) aU (F) C (F) U (F) GC (F) GU (F) GGC (F) U (F) GU (F) U (F) aC (F) C (F) C (F)

SEQ ID NO: 41:

GGGU (F) C (F) C (F) U (F) GC (F) U (F) GC (F) GaaGU (F) U (F) U (F) C (F) C (F) U (F) U (F) C (F) U (F) U (F) C (F) GU (F) GGC (F) U (F) GU (F) U (F) aC (F) C (F) C (F)

SEQ ID NO: 42:

GGGU (F) C (F) C (F) U (F) GC (F) U (F) GC (F) GC (F) aGU (F) U (F) U (F) C (F) C (F) C (F) U (F) C (F) U (F) GC (F) GU (F) GGC (F) U (F) GU (F) U (F) aC (F) C (F) C (F)

SEQ ID NO: 43:

GGGU (F) C (F) C (F) U (F) GC (F) U (F) GC (F) GGaGU (F) U (F) U (F) C (F) C (F) U (F) U (F) C (F) U (F) U (F) C (F) GU (F) GGC (F) U (F) GU (F) U (F) aC (F) C (F) C (F)

SEQ ID NO: 44:

GGGU (F) C (F) C (F) U (F) GC (F) C (F) GC (F) GU (F) aGU (F) U (F) U (F) C (F) C (F) GU (F) C (F) U (F) GC (F) GU (F) GGC (F) U (F) GU (F) U (F) aC (F) C (F) C (F)

SEQ ID NO: 45:

GGGU (F) C (F) C (F) U (F) GU (F) U (F) GC (F) GU (F) aGU (F) U (F) U (F) C (F) C (F) U (F)
) U (F) C (F) U (F) aC (F) GU (F) GGC (F) U (F) GU (F) U (F) aC (F) C (F) C (F)

SEQ ID NO: 46: (forma acortada de SEQ ID NO: 25)

GGGU (F) C (F) C (F) U (F) GC (F) U (F) GC (F) GC (F) aGU (F) U (F) U (F) C (F) C (F) GU (F)
 F) C (F) U (F) aC (F) GU (F) GGC (F) U (F) GU (F) U (F) aC (F) C (F) C (F)

5 SEQ ID NO: 47: (forma acortada de SEQ ID NO: 26)

GGGU (F) C (F) C (F) U (F) GC (F) U (F) GC (F) GU (F) aGU (F) U (F) U (F) C (F) C (F) GU (F)
 F) C (F) U (F) U (F) C (F) GC (F) GGC (F) U (F) GU (F) U (F) aC (F) C (F) C (F)

La estructura secundaria de estos aptámeros se predijo utilizando el programa MFOLD para encontrar que todos ellos tenían una estructura mostrada por la estructura secundaria de consenso 1.

Ejemplo 10: producción del aptámero – 4 de NGF

10 Se realizó SELEX usando un conjunto de ARN que contenía una secuencia mostrada por la SEQ ID NO: 12 dopada con unos 21% de secuencia aleatoria y apegada con secuencias de cebador, similares a las del Ejemplo 1, a sus dos extremos. SELEX se realizó de la misma manera que en el Ejemplo 1. La secuencia de la plantilla se muestra a continuación.

Plantilla 3:

5' -gaggatccatgtatgcgcacata-
acagccacgggagacggaaaactacgcagcaggatgtgccaa-cttctggtcgaagttctccc-
 15 3' (SEQ ID NO: 145)

En la secuencia, la secuencia de la base subrayada es como se describe a continuación.

a: a (79%), g (7%), c (7%), t (7%)

g: a (7%), g (79%), c (7%), t (7%)

c: a (7%), g (7%), c (79%), t (7%)

20 t: a (7%), g (7%), c (7%), t (79%)

Después de completar 4 rondas, se confirmaron las secuencias de 48 clones, pero no se observó la convergencia de la secuencia. Por lo tanto, se realizaron 3 rondas más. En 5, 6, 7 rondas, se confirmó las secuencias de 48 clones y se encontró convergencia de secuencia a medida que avanzaban las rondas. En la séptima ronda, casi todas las secuencias mostraron convergencia.

25 Se seleccionaron un total de 14 secuencias de 5, 6, 7 rondas, y se midió la actividad de unión a NGF mediante el método de resonancia de plasmón superficial. El método de medición es como se muestra en el Ejemplo 1. Como resultado de la medición, todas las secuencias se unieron significativamente a NGF más que el 40N de control. Las secuencias de nucleótidos actualmente obtenidas se muestran a continuación.

SEQ ID NO: 48:

GGGaGaaC (F) U (F) U (F) C (F) GaC (F) C (F) aGaaGU (F) U (F) GGC (F) aC (F) aU (F) C
 (F) C (F) U (F) GC (F) U (F) GC (F) GGaGU (F) U (F) U (F) C (F) C (F) GU (F) C (F) U (F) C
 (F) GGU (F) GGC (F) U (F) GU (F) U (F) aU (F) GU (F) GC (F) GC (F) aU (F) aC (F) aU (F)
 30 GGaU (F) C (F) C (F) U (F) C (F)

SEQ ID NO: 49:

GGGaGaaC (F) U (F) U (F) C (F) GaC (F) C (F) aGaaGU (F) U (F) U (F) GC (F) aC (F) aU (F) C (F) C (F) U (F) GC (F) U (F) GC (F) GU (F) aGU (F) U (F) U (F) C (F) C (F) GU (F) C (F)) U (F) aC (F) GU (F) GGC (F) U (F) GU (F) U (F) aU (F) GU (F) GC (F) GC (F) aU (F) aC (F)) aU (F) GGaU (F) C (F) C (F) U (F) C (F)

SEQ ID NO: 50:

GGGaGaaC (F) U (F) U (F) C (F) GaC (F) C (F) aGaaGC (F) U (F) GGC (F) aC (F) aU (F) C (F) C (F) U (F) GU (F) U (F) GC (F) GU (F) aGU (F) U (F) U (F) C (F) C (F) GU (F) C (F) U (F) aC (F) GU (F) GaC (F) U (F) GU (F) U (F) aU (F) GU (F) GC (F) GC (F) aU (F) aC (F) aU (F) GGaU (F) C (F) C (F) U (F) C (F)

5 SEQ ID NO: 51:

GGGaGaaC (F) U (F) U (F) C (F) GaC (F) C (F) aGaaGU (F) U (F) GGC (F) aC (F) aC (F) C (F) C (F) U (F) GC (F) U (F) aC (F) GGaGU (F) U (F) U (F) C (F) C (F) GU (F) C (F) U (F) C (F) GGU (F) GGC (F) U (F) GU (F) U (F) aU (F) GU (F) GC (F) GC (F) aU (F) aC (F) aU (F) GGaU (F) C (F) C (F) U (F) C (F)

SEQ ID NO: 52:

GGGaGaaC (F) U (F) U (F) C (F) GaC (F) C (F) aGaaGU (F) U (F) GGC (F) aC (F) aU (F) C (F) C (F) U (F) GC (F) U (F) GC (F) aU (F) aGU (F) U (F) U (F) C (F) C (F) GU (F) C (F) U (F) U (F) U (F) GU (F) GGC (F) U (F) GU (F) U (F) aU (F) GU (F) GC (F) GC (F) aU (F) aC (F)) aU (F) GGaU (F) C (F) C (F) U (F) C (F)

SEQ ID NO: 53:

GGGaGaaC (F) U (F) U (F) C (F) GaC (F) C (F) aGaaGU (F) U (F) U (F) GC (F) aC (F) aU (F) C (F) C (F) U (F) GC (F) U (F) GC (F) GC (F) aGU (F) U (F) U (F) C (F) C (F) GU (F) C (F)) U (F) aC (F) GU (F) GGC (F) U (F) GU (F) U (F) aU (F) GU (F) GC (F) GC (F) aU (F) aC (F)) aU (F) GGaU (F) C (F) C (F) U (F) C (F)

10

SEQ ID NO: 54:

GGGaGaaC (F) U (F) U (F) C (F) GaC (F) C (F) aGaaGU (F) U (F) GGC (F) aC (F) aU (F) C (F) C (F) U (F) GaU (F) GC (F) GU (F) aGU (F) U (F) U (F) C (F) C (F) GU (F) C (F) U (F) G C (F) GU (F) GU (F) C (F) U (F) GU (F) U (F) aU (F) GU (F) GC (F) GC (F) aU (F) aC (F) aU (F) GGaU (F) C (F) C (F) U (F) C (F)

SEQ ID NO: 55:

GGGaGaaC (F) U (F) U (F) C (F) GaC (F) C (F) aGaaGU (F) U (F) GGC (F) aC (F) aU (F) C (F) C (F) U (F) GU (F) U (F) GC (F) GU (F) aGU (F) U (F) U (F) C (F) C (F) GU (F) C (F) U (F) GC (F) GU (F) GGC (F) U (F) GU (F) U (F) aU (F) GU (F) GC (F) GC (F) aU (F) aC (F) aU (F) GGaU (F) C (F) C (F) U (F) C (F)

15

SEQ ID NO: 56:

GGGaGaaC (F) U (F) U (F) C (F) GaC (F) C (F) aGaaGU (F) U (F) GC (F) aC (F) aU (F) C (F) C (F) U (F) GC (F) U (F) GU (F) GU (F) aGU (F) U (F) U (F) C (F) C (F) GU (F) C (F) U (F)) GC (F) aU (F) GGU (F) U (F) GU (F) U (F) aU (F) GU (F) GC (F) GC (F) aU (F) aC (F) aU (F) GGaU (F) C (F) C (F) U (F) C (F)

SEQ ID NO: 57:

GGGaGaaC (F) U (F) U (F) C (F) GaC (F) C (F) aGaaGU (F) aGGC (F) aC (F) GU (F) C (F) C (F) U (F) GC (F) U (F) GC (F) aU (F) aGU (F) U (F) U (F) C (F) C (F) GU (F) C (F) U (F) G U (F) GU (F) GGC (F) U (F) GU (F) U (F) aU (F) GU (F) GC (F) GC (F) aU (F) aC (F) aU (F) GGaU (F) C (F) C (F) U (F) C (F)

5 SEQ ID NO: 58:

GGGaGaaC (F) U (F) U (F) C (F) GaC (F) C (F) aGaaGU (F) U (F) GaC (F) aC (F) aU (F) C (F) C (F) U (F) GC (F) U (F) GC (F) GU (F) aGU (F) U (F) U (F) C (F) C (F) GU (F) C (F) U (F)) GC (F) GU (F) GGU (F) U (F) GU (F) U (F) aU (F) GU (F) GC (F) GC (F) aU (F) aC (F) aU (F) GGaU (F) C (F) C (F) U (F) C (F)

SEQ ID NO: 59:

GGGaGaaC (F) U (F) U (F) C (F) GaC (F) C (F) aGaaGU (F) U (F) U (F) GC (F) aC (F) aU (F) C (F) C (F) U (F) GC (F) U (F) GC (F) GU (F) aGU (F) U (F) U (F) C (F) C (F) U (F) U (F) C (F) U (F) GC (F) GU (F) GGU (F) U (F) GU (F) U (F) aU (F) GU (F) GC (F) GC (F) aU (F) a C (F) aU (F) GGaU (F) C (F) C (F) U (F) C (F)

SEQ ID NO: 60:

GGGaGaaC (F) U (F) U (F) C (F) GaC (F) C (F) aGaaGU (F) U (F) GGC (F) aC (F) aU (F) C (F) C (F) U (F) GC (F) U (F) GC (F) aGaGU (F) U (F) U (F) C (F) C (F) GU (F) C (F) U (F) C (F) GGU (F) GGC (F) U (F) GU (F) U (F) aU (F) GU (F) GC (F) GC (F) aU (F) aC (F) aU (F) GGaU (F) C (F) C (F) U (F) C (F)

SEQ ID NO: 61:

GGGaGaaC (F) U (F) U (F) C (F) GaC (F) C (F) aGaaGU (F) U (F) aGC (F) aC (F) aU (F) C (F) C (F) U (F) GC (F) U (F) GC (F) GU (F) aGU (F) U (F) U (F) C (F) C (F) GU (F) C (F) U (F)) U (F) C (F) GC (F) GGU (F) U (F) GU (F) U (F) aU (F) GU (F) GC (F) GC (F) aU (F) aC (F) aU (F)) aU (F) GGaU (F) C (F) C (F) U (F) C (F)

15 La estructura secundaria de estos aptámeros se predijo utilizando el programa MFOLD para encontrar que todos ellos tenían una estructura mostrada por la estructura secundaria de consenso 1. El lado 5' de todas las secuencias de los bucles internos 1 fue CCU y el lado 3' fue UGUU. Además, el bucle 2 contenía una secuencia de consenso mostrada por 5'-UUUCCXU-3'. Aquí, X es G o U. Los pares de bases 1°, 3°, 8° y 9° del tallo 2 fueron G-C, U-G, a-U y G-C, respectivamente. El 2° y 4°-7° contenían algunos pares de bases diferentes.

20 De la misma manera que en el Ejemplo 4, estos aptámeros se sometieron a acortamiento. Como resultado, en todos los aptámeros, la cadena pudo acortarse a una estructura similar a la estructura secundaria de consenso 1 mientras que se mantuvo la actividad de unión.

De la misma manera que en los ejemplos 3 y 8, se evaluaron la actividad inhibidora de la extensión de la neurita y la actividad inhibidora de la proliferación de células TF-1. Como resultado, todos estos aptámeros mostraron una alta actividad inhibidora a una concentración de 10 nM. Las secuencias de nucleótidos actualmente obtenidas se

muestran a continuación.

SEQ ID NO: 62:

GGGU (F) C (F) C (F) U (F) GC (F) U (F) GC (F) GGaGU (F) U (F) U (F) C (F) C (F) GU (F) C
(F) U (F) C (F) GGU (F) GGC (F) U (F) GU (F) U (F) aC (F) C (F) C (F)

SEQ ID NO: 63:

5 GGGU (F) C (F) C (F) U (F) GC (F) U (F) GC (F) GU (F) aGU (F) U (F) U (F) C (F) C (F) GU (F)
C (F) U (F) aC (F) GU (F) GGC (F) U (F) GU (F) U (F) aC (F) C (F) C (F)

SEQ ID NO: 64:

GGGU (F) C (F) C (F) U (F) GU (F) U (F) GC (F) GU (F) aGU (F) U (F) U (F) C (F) C (F) GU (F)
C (F) U (F) aC (F) GU (F) GaC (F) U (F) GU (F) U (F) aC (F) C (F) C (F)

SEQ ID NO: 65:

10 GGGU (F) C (F) C (F) U (F) GC (F) U (F) aC (F) GGaGU (F) U (F) U (F) C (F) C (F) GU (F) C
(F) U (F) C (F) GGU (F) GGC (F) U (F) GU (F) U (F) aC (F) C (F) C (F)

SEQ ID NO: 66:

GGGU (F) C (F) C (F) U (F) GC (F) U (F) GC (F) aU (F) aGU (F) U (F) U (F) C (F) C (F) GU (F)
C (F) U (F) U (F) U (F) GU (F) GGC (F) U (F) GU (F) U (F) aC (F) C (F) C (F)

SEQ ID NO: 67:

GGGU (F) C (F) C (F) U (F) GC (F) U (F) GC (F) GC (F) aGU (F) U (F) U (F) C (F) C (F) GU (F)
C (F) U (F) aC (F) GU (F) GGC (F) U (F) GU (F) U (F) aC (F) C (F) C (F)

SEQ ID NO: 68:

15 GGGU (F) C (F) C (F) U (F) GaU (F) GC (F) GU (F) aGU (F) U (F) U (F) C (F) C (F) GU (F) C
(F) U (F) GC (F) GU (F) GU (F) C (F) U (F) GU (F) U (F) aC (F) C (F) C (F)

SEQ ID NO: 69:

GGGU (F) C (F) C (F) U (F) GU (F) U (F) GC (F) GU (F) aGU (F) U (F) U (F) C (F) C (F) GU (F)
C (F) U (F) GC (F) GU (F) GGC (F) U (F) GU (F) U (F) aC (F) C (F) C (F)

SEQ ID NO: 70:

20 GGGU (F) C (F) C (F) U (F) GC (F) U (F) GU (F) GU (F) aGU (F) U (F) U (F) C (F) C (F) GU (F)
C (F) U (F) GC (F) aU (F) GGU (F) U (F) GU (F) U (F) aC (F) C (F) C (F)

SEQ ID NO: 71:

GGGU (F) C (F) C (F) U (F) GC (F) U (F) GC (F) aU (F) aGU (F) U (F) U (F) C (F) C (F) GU (F)
C (F) U (F) GU (F) GU (F) GGC (F) U (F) GU (F) U (F) aC (F) C (F) C (F)

SEQ ID NO: 72:

GGGU (F) C (F) C (F) U (F) GC (F) U (F) GC (F) GU (F) aGU (F) U (F) U (F) C (F) C (F) GU (F)
C (F) U (F) GC (F) GU (F) GGU (F) U (F) GU (F) U (F) aC (F) C (F) C (F)

SEQ ID NO: 73:

GGGU (F) C (F) C (F) U (F) GC (F) U (F) GC (F) GU (F) aGU (F) U (F) U (F) C (F) C (F) U (F)
) U (F) C (F) U (F) GC (F) GU (F) GGU (F) U (F) GU (F) U (F) aC (F) C (F) C (F)

SEQ ID NO: 74:

GGGU (F) C (F) C (F) U (F) GC (F) U (F) GC (F) aGaGU (F) U (F) U (F) C (F) C (F) GU (F) C
(F) U (F) C (F) GGU (F) GGC (F) U (F) GU (F) U (F) aC (F) C (F) C (F)

5 SEQ ID NO: 75:

GGGU (F) C (F) C (F) U (F) GC (F) U (F) GC (F) GU (F) aGU (F) U (F) U (F) C (F) C (F) GU (F)
(F) C (F) U (F) U (F) C (F) GC (F) GGU (F) U (F) GU (F) U (F) aC (F) C (F) C (F)

Ejemplo 11: producción del aptámero -5 de NGF

Usando la siguiente plantilla en donde el tallo 2 en la estructura secundaria de consenso 1 se aleatoriza, el SELEX se realizó de la misma manera que en el Ejemplo 1.

10 plantilla 4:

5' -

gaggatccatgtatgcgcacataacagnnnnnnngacggaaa cnnnnnnncaggatgtgcca

cttctggtcgaagttctccc-3' (SEQ ID NO: 147)

Después de completar 7 rondas, se confirmaron las secuencias de 48 clones, pero no se observó la convergencia de la secuencia. Por lo tanto, se realizaron 3 rondas más. Después de completar 10 rondas, se confirmó las secuencias de 48 clones y se encontró convergencia en aproximadamente la mitad de las secuencias. Las restantes medias secuencias fueron secuencias únicas. Se seleccionaron 17 secuencias de las mismas y se midió la actividad de unión a NGF mediante el método de resonancia de plasmón superficial. El método de medición es como se muestra en el Ejemplo 1. Como resultado de la medición, se encontró que todas las secuencias se unen más significativamente al NGF que la 40N de control.

20 De la misma manera que en el Ejemplo 4, los aptámeros mencionados anteriormente se sometieron a acortamiento. Como resultado, en todos los aptámeros, la cadena pudo acortarse a una estructura similar a la estructura secundaria de consenso 1 mientras que se mantuvo la actividad de unión. Las secuencias de nucleótidos actualmente obtenidas se muestran a continuación.

SEQ ID NO: 76

GGGU (F) C (F) C (F) U (F) GaU (F) U (F) aaGaGU (F) U (F) U (F) C (F) C (F) GU (F) C (F)
U (F) C (F) GU (F) aaU (F) C (F) U (F) GU (F) U (F) aC (F) C (F) C (F)

25 SEQ ID NO: 77

GGGU (F) C (F) C (F) U (F) GaC (F) U (F) aaGaGU (F) U (F) U (F) C (F) C (F) GU (F) C (F)
U (F) C (F) GU (F) aGU (F) C (F) U (F) GU (F) U (F) aC (F) C (F) C (F)

SEQ ID NO: 78

GGGU (F) C (F) C (F) U (F) GGC (F) C (F) aaGaGU (F) U (F) U (F) C (F) C (F) GU (F) C (F)
U (F) C (F) GU (F) GGU (F) C (F) U (F) GU (F) U (F) aC (F) C (F) C (F)

SEQ ID NO: 79

30 GGGU (F) C (F) C (F) U (F) GGU (F) U (F) aaGaGU (F) U (F) U (F) C (F) C (F) GU (F) C (F)
U (F) C (F) GU (F) aaC (F) C (F) U (F) GU (F) U (F) aC (F) C (F) C (F)

SEQ ID NO 80

GGGU (F) C (F) C (F) U (F) GGC (F) U (F) aaGaGU (F) U (F) U (F) C (F) C (F) GU (F) C (F)
U (F) C (F) GU (F) aGU (F) C (F) U (F) GU (F) U (F) aC (F) C (F) C (F)

SEQ ID NO: 81

GGGU (F) C (F) C (F) U (F) GGU (F) GaU (F) aaGU (F) U (F) U (F) C (F) C (F) GU (F) C (F)
U (F) U (F) aU (F) C (F) aC (F) C (F) U (F) GU (F) U (F) aC (F) C (F) C (F)

5 SEQ ID NO: 82

GGGU (F) C (F) C (F) U (F) GGaU (F) aaGaGU (F) U (F) U (F) C (F) C (F) GU (F) C (F) U (F)
) C (F) GU (F) aU (F) C (F) C (F) U (F) GU (F) U (F) aC (F) C (F) C (F)

SEQ ID NO: 83

GGGU (F) C (F) C (F) U (F) GU (F) aC (F) aaGaGU (F) U (F) U (F) C (F) C (F) GU (F) C (F)
U (F) C (F) GU (F) GU (F) aC (F) U (F) GU (F) U (F) aC (F) C (F) C (F)

SEQ ID NO: 84

10 GGGU (F) C (F) C (F) U (F) GU (F) C (F) GC (F) U (F) aaGU (F) U (F) U (F) C (F) C (F) GU (F)
C (F) U (F) U (F) U (F) GC (F) GGC (F) U (F) GU (F) U (F) aC (F) C (F) C (F)

SEQ ID NO: 85

GGGU (F) C (F) C (F) U (F) GaGU (F) aaGaGU (F) U (F) U (F) C (F) C (F) GU (F) C (F) U (F)
) C (F) aU (F) aC (F) U (F) C (F) U (F) GU (F) U (F) aC (F) C (F) C (F)

SEQ ID NO: 86

GGGU (F) C (F) C (F) U (F) GC (F) U (F) GC (F) GU (F) aGU (F) U (F) U (F) C (F) C (F) U (F)
) U (F) C (F) U (F) GC (F) GU (F) GGU (F) U (F) GU (F) U (F) aC (F) C (F) C (F)

15 SEQ ID NO: 87

GGGU (F) C (F) C (F) U (F) GC (F) U (F) C (F) aaGaGU (F) U (F) U (F) C (F) C (F) GU (F) C
(F) U (F) C (F) GU (F) GGGC (F) U (F) GU (F) U (F) aC (F) C (F) C (F)

SEQ ID NO: 88

GGGU (F) C (F) C (F) U (F) GU (F) U (F) C (F) aaGaGU (F) U (F) U (F) C (F) C (F) GU (F) C
(F) U (F) C (F) GU (F) GaaC (F) U (F) GU (F) U (F) aC (F) C (F) C (F)

SEQ ID NO: 89

20 GGGU (F) C (F) C (F) U (F) GU (F) GGaaGaGU (F) U (F) U (F) C (F) C (F) GU (F) C (F) U (F)
) C (F) GU (F) C (F) C (F) aC (F) U (F) GU (F) U (F) aC (F) C (F) C (F)

SEQ ID NO: 90

GGGU (F) C (F) C (F) U (F) GC (F) GU (F) aaGaGU (F) U (F) U (F) C (F) C (F) GU (F) C (F)
U (F) C (F) GU (F) aU (F) GC (F) U (F) GU (F) U (F) aC (F) C (F) C (F)

SEQ ID NO: 91

GGGU (F) C (F) C (F) U (F) GC (F) C (F) U (F) aaGaGU (F) U (F) U (F) C (F) C (F) GU (F) C
(F) U (F) C (F) GU (F) aGGC (F) U (F) GU (F) U (F) aC (F) C (F) C (F)

SEQ ID NO: 92

**GGGU (F) C (F) C (F) U (F) GaC (F) C (F) aaGaGU (F) U (F) U (F) C (F) C (F) GU (F) C (F)
U (F) C (F) GU (F) GGU (F) C (F) U (F) GU (F) aC (F) C (F) C (F)**

5 Tomando la longitud de la neurita por célula obtenida mediante la adición de NGF solo como actividad inhibidora 0%, y la de la célula obtenida por cultivo sin NGF durante 2 días como actividad inhibidora 100%, las actividades inhibidoras de crecimiento de la neurita de estos aptámeros fueron calculadas a partir de la longitud de la neurita por célula obtenida cultivando con la adición de NGF y el aptámero en la mezcla. La concentración inhibidora del 50% (CI₅₀) se determinó a partir de las concentraciones en dos puntos, por encima y por debajo, intercalando la actividad inhibidora del 50%. Los resultados del experimento se muestran en la Tabla 1. En la Tabla 1, el valor de CI₅₀ indicado como "<X" significa que la actividad inhibidora no fue menor del 50% cuando la concentración indicada X era la concentración medida mínima. Todos los aptámeros probados mostraron una fuerte actividad inhibidora. Sus valores CI₅₀ se muestran parcialmente en la Tabla 1.

15 Con respecto a la actividad inhibidora de la proliferación celular TF-1, usando la cantidad de luminiscencia por pocillo obtenida por la adición de NGF solo y cultivo de las células durante 3 días como actividad inhibidora 0%, y la del pocillo obtenida por cultivo sin NGF durante 3 días como actividad inhibidora al 100%, la actividad inhibidora del aptámero se calculó a partir de la cantidad de luminiscencia por pocillo obtenida cultivando con la adición de NGF y el aptámero en la mezcla. La concentración inhibidora del 50% (CI₅₀) se determinó a partir de las concentraciones en dos puntos, por encima y por debajo, intercalando la actividad inhibidora del 50%. Los resultados se muestran en la Tabla 1. El valor de CI₅₀ indicado como "<X" significa que la actividad inhibidora no fue menor del 50% cuando la concentración indicada X era la concentración medida mínima. Como resultado del experimento, se encontró que el valor CI₅₀ de los aptámeros distintos de SEQ ID NOs: 81, 84, 86, 89 no fue mayor de 1 nM.

20 El lado 5' de todas las secuencias de los bucles internos 1 en estos aptámeros fue CCU y el lado 3' fue UGUU. Además, el bucle 2 contenía una secuencia de consenso mostrada por 5'-UUUCCXU-3'. Aquí, X es G o U. El último par de bases del tallo 1 siempre fue U-a. Los pares de bases 1º, 8º y 9º del tallo 2 fueron G-C, a-U y G-C, respectivamente. Del 2º-7º contenían algunos pares de bases diferentes.

25 Ejemplo 12: producción del aptámero -6 de NGF

30 Para producir un aptámero que inhiba NGF pero no inhiba NT-3 y NT-4, se realizó un nuevo SELEX. Como primer grupo, los conjuntos de ARN usados primero en los Ejemplos 9 y 10 se mezclaron a 1:1 y se usaron. El conjunto de ARN antes de la selección se mezcló con NT-3 (fabricado por R & D Systems, 294 pmoles), NT-4 (fabricado por R & D Systems, 179 pmoles) y BDNF (fabricado por R & D Systems, 148 pmoles), y se añadió la mezcla a perlas con NGF (380 pmoles) inmovilizado sobre las mismas.

35 Después de completar 4 rondas, se confirmó que las secuencias de 48 clones no encontraban convergencia de secuencia. Algunas secuencias individuales tenían las mismas secuencias que SEQ ID NOs: 27, 28, 34, 64, 72. Se seleccionaron 14 nuevas secuencias y se predijo la estructura secundaria usando el programa MFOLD para encontrar que todas contenían la estructura secundaria de consenso 1. Por lo tanto, estos aptámeros se sometieron a acortamiento a 40 mer de la misma manera que con la estructura secundaria de consenso 1. La actividad de unión de estas formas acortadas a NGF y NT-3 se midió mediante el método de resonancia de plasmón superficial. Para el método de medición, se usó un BIAcore2000 fabricado por BIAcore y se usó el reactivo CM5 con grupo amino como sensor de chip, como se muestra en el Ejemplo 1. La proteína se inmovilizó de la misma manera que en el Ejemplo 1 usando hidrocloreto de etil-3-carbodiimida y N-hidroxisuccinimida. Se disolvió NGF o NT-3 humano en una solución de inmovilización (acetato de sodio 10 mM, pH 6) y se usó a 25-40 µg/ml. Después de la inmovilización de la proteína, se realizó el bloqueo con etanolamina-HCl. La cantidad de NGF y NT-3 inmovilizados fue de 3.000 a 4.000 RU y de 3.000 a 5.000 RU, respectivamente. El aptámero como analito se preparó a de 0,15 µM-0,5 µM. El tampón de ejecución y la solución de regeneración fueron los mismos que en el Ejemplo 1. NT-3 se inmovilizó en FC2, y NGF en FC3, y el sensorgrama final se obtuvo restando los resultados de FC1. En consecuencia, se encontró que 7 secuencias se unían fuertemente a NGF. Por otro lado, casi no hubo secuencias vinculadas a NT-3.

45 De la misma manera que en el Ejemplo 3, se midió la actividad inhibidora del crecimiento de la neurita para encontrar que el aptámero mostrado por las SEQ ID NOs: 93-98 mostró una fuerte actividad inhibidora a 10 nM. Las secuencias de nucleótidos actualmente obtenidas, que corresponden a cada SEQ ID NO, se muestran a continuación.

50 SEQ ID NO: 93:

**GGGU (F) C (F) C (F) U (F) GC (F) C (F) GC (F) GU (F) aGU (F) U (F) U (F) C (F) C (F) GU (F)
F) C (F) U (F) U (F) C (F) GC (F) GGU (F) U (F) GU (F) U (F) aC (F) C (F) C (F)**

SEQ ID NO: 94:

GGGU (F) C (F) C (F) U (F) GC (F) U (F) GC (F) GU (F) aGU (F) U (F) U (F) C (F) C (F) GU (F) C (F) U (F) GC (F) GGaGC (F) U (F) GU (F) U (F) aC (F) C (F) C (F)

SEQ ID NO: 95:

GGGU (F) C (F) C (F) U (F) GC (F) U (F) GC (F) GU (F) aGU (F) U (F) U (F) C (F) C (F) aU (F) C (F) U (F) U (F) C (F) GU (F) GGC (F) U (F) GU (F) U (F) aC (F) C (F) C (F)

5 SEQ ID NO: 96:

GGGU (F) C (F) C (F) U (F) GC (F) U (F) GC (F) GU (F) aGU (F) U (F) U (F) C (F) C (F) GU (F) C (F) U (F) aU (F) GU (F) GGC (F) U (F) GU (F) U (F) aC (F) C (F) C (F)

SEQ ID NO: 97:

GGGU (F) C (F) C (F) U (F) GC (F) U (F) aC (F) GU (F) aGU (F) U (F) U (F) C (F) C (F) GU (F) C (F) U (F) GC (F) GU (F) GGC (F) U (F) GU (F) U (F) aC (F) C (F) C (F)

SEQ ID NO: 98:

10 GGGU (F) C (F) C (F) U (F) GC (F) U (F) aC (F) GU (F) aGU (F) U (F) U (F) C (F) C (F) GU (F) C (F) U (F) aC (F) GU (F) GGC (F) U (F) GU (F) U (F) aC (F) C (F) C (F)

El lado 5' de todas las secuencias de los bucles internos 1 en estos aptámeros fue CCU y el lado 3' fue UGUU. Además, el bucle 2 contenía una secuencia de consenso mostrada por 5'-UUUCCXU-3'. Aquí, X es o G o a. El par de bases final del tallo 1 siempre fue U-a. Los pares de bases 2º, 5º, 8º y 9º del tallo 2 fueron C-G, C-G, a-U y G-C, respectivamente. Hubo algunos pares de bases diferentes en los otros.

15 Se realizó SELEX hasta 7 rondas y se confirmaron las secuencias de 48 clones y se encontró que la mayor parte de las secuencias convergen en un tipo de secuencia. Se seleccionaron 13 secuencias únicas del resto, y se examinó la actividad de unión a NGF y NT-3 mediante el método de resonancia de plasmón superficial y de la misma manera que anteriormente. En consecuencia, se encontró que 7 secuencias se unían fuertemente a NGF. Por otro lado, casi no hay secuencias vinculadas a NT-3.

20 Se predijo la estructura secundaria de estos aptámeros usando el programa MFOLD para encontrar que todos no tenían la estructura secundaria de consenso 1. De la misma manera que en el Ejemplo 3, se midió la actividad inhibitoria de la extensión de la neurita y se encontró que los aptámeros mostrados por SEQ ID NOs: 99 y 100 mostraron una fuerte actividad inhibitoria a 10 nM. Por otro lado, la actividad inhibitoria de la proliferación celular TF-1 se midió de la misma manera que en el Ejemplo 8 para no encontrar actividad inhibitoria. Las secuencias de nucleótidos actualmente obtenidas, que corresponden a cada SEQ ID NO, se muestran a continuación.

SEQ ID NO: 99:

GGGaGaaC (F) U (F) U (F) C (F) GaC (F) C (F) aGaaGU (F) C (F) C (F) aaaC (F) GGGaC (F) U (F) U (F) U (F) aU (F) aC (F) C (F) U (F) C (F) U (F) GaGU (F) C (F) GC (F) C (F) U (F)) U (F) U (F) GC (F) U (F) C (F) C (F) U (F) aU (F) GU (F) GC (F) GC (F) aU (F) aC (F) aU (F) GGaU (F) C (F) C (F) U (F) C (F)

SEQ ID NO: 100:

30 GGGaGaaC (F) U (F) U (F) C (F) GaC (F) C (F) aGaaGaC (F) C (F) aaaC (F) GGGaC (F) U (F) U (F) U (F) aU (F) aC (F) C (F) U (F) C (F) U (F) GaGU (F) C (F) GC (F) C (F) U (F) aU (F) GC (F) U (F) C (F) C (F) U (F) aU (F) GU (F) GC (F) GC (F) aU (F) aC (F) aU (F) GGaU (F) C (F) C (F) U (F) C (F)

Ejemplo 13: producción del aptámero -7 de NGF

Se realizó un nuevo SELEX de la misma manera que en el Ejemplo 12 para producir un aptámero que inhiba NGF

pero que no inhiba NT-3 y NT-4. La plantilla y el cebador utilizados por primera vez para el conjunto de ARN son los que se describen a continuación.

plantilla 5:

5' –

**gaggatccatgtatgcgcacatnnnnggatacgagnnnnnnnctcttatccnnnatgtgcca
cttctggctgaagtctccc-3' (SEQ ID NO: 148)**

5 En la secuencia, la secuencia de la base subrayada es como se describe a continuación.

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

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

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

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

10 cebador Fwd3:

5'-taatacgaactcactatagggagaacttcgaccagaagttggcaca (SEQ ID NO: 149)

Cebador Rev3:

5'-gaggatccatgtatgcgca (SEQ ID NO: 150)

15 La secuencia de la plantilla se basó en la secuencia mostrada por SEQ ID NO: 82, el tallo 2 de la estructura secundaria de consenso 1 se dopó con 30% de la secuencia aleatoria, y las secciones del bucle interno 1 y del bucle 2 se aleatorizaron completamente (n).

20 Después de completar 4 rondas, se confirmó las secuencias de 48 clones y se encontró que 21 clones eran idénticos a la secuencia mostrada por SEQ ID NO: 22. De las secuencias restantes, 2 clones fueron iguales, y otros fueron secuencias únicas. Se seleccionaron 13 secuencias a partir de las mismas y se predijo la estructura secundaria usando el programa MFOLD para encontrar que tenían la estructura secundaria de consenso 1. Después, los aptámeros se sometieron a acortamiento a 40 mer de la misma manera que con la estructura secundaria de consenso 1. La actividad de unión de los aptámeros acortados se confirmó mediante el método de resonancia de plasmón superficial de la misma manera que en el Ejemplo 12. Se midió NT-4 de la misma manera que NT-3. Como resultado, se encontró que las formas abreviadas se unen fuertemente a NGF. Por otro lado, la unión a NT-3 y NT-4 fue débil.

25 De la misma manera que en el Ejemplo 3, se midió la actividad inhibidora del crecimiento de la neurita de estas formas acortadas para encontrar que los aptámeros mostrados por las SEQ ID NOs: 101 y 102 mostraron una fuerte actividad inhibidora como se evidencia por un valor CI_{50} de 1 nM o inferior (Tabla 1). Por otro lado, la actividad inhibidora de la proliferación celular TF-1 se midió de la misma manera que en el Ejemplo 8 para encontrar que el valor CI_{50} de los mismos dos aptámeros no era menor que 1 nM. Las secuencias de nucleótidos actualmente obtenidas, que corresponden a cada SEQ ID NO, se muestran a continuación.

SEQ ID NO: 101:

**GGGU (F) C (F) C (F) U (F) GaC (F) GU (F) aU (F) aGU (F) U (F) U (F) C (F) C (F) GU (F) C
(F) U (F) GU (F) aU (F) GU (F) C (F) U (F) GU (F) U (F) aC (F) C (F) C (F)**

SEQ ID NO: 102:

35 **GGGU (F) C (F) C (F) U (F) GaGC (F) aaGaGU (F) U (F) U (F) C (F) C (F) GU (F) C (F) U (F)
) C (F) aU (F) GC (F) U (F) C (F) U (F) GU (F) U (F) aC (F) C (F) C (F)**

Ejemplo 14: Análisis de secuencia usando un secuenciador de alta velocidad

40 Para obtener un aptámero que tenga una estructura secundaria de consenso 1, que inhiba a NGF pero no inhiba a otras neurotrofinas, se analizaron las secuencias usando el secuenciador de alta velocidad GS FLX (fabricado por Roche). Mientras que el análisis de secuencia de 48 clones se realizó por secuenciación de Sanger en el Ejemplo 1, el uso de un secuenciador de alta velocidad permite el análisis de decenas de miles de secuencias. La medición y el análisis de los datos se realizaron en Operon, y la preparación de la muestra se realizó según el protocolo de Operon. El ADN diana de medición fue una mezcla equimolar de conjuntos de ADN después de completar 7, 9 y 10

rondas obtenidas con SELEX en el Ejemplo 8, 4 y 5 rondas obtenidas con SELEX en el Ejemplo 12, y 3 y 4 rondas obtenidas con SELEX en el Ejemplo 13.

El número total de las secuencias obtenidas fue 69.249. Entre ellas, 40.077 contenían una secuencia del cebador FLX completamente idéntica o una secuencia del cebador FLX en la que una base está sustituida, y una secuencia parcial de N40 con una longitud de 40. La estructura secundaria de estas secuencias se predijo utilizando el programa RNAfold y se encontraron 22.453 secuencias que contenían la misma estructura que la estructura secundaria de consenso 1. Cuando se comparó con las secuencias obtenidas en los Ejemplos 10, 12, 13 mediante secuenciación de Sanger, el 99% fueron secuencias nuevas. Entre las nuevas secuencias, 1.615 tipos de secuencias contenían convergencia, y 4.168 secuencias fueron secuencias únicas. Las 52 secuencias nuevas que surgieron con mucha frecuencia se seleccionaron a partir de las mismas y se sometieron a acortamiento a 40 mer para proporcionar la forma de la estructura secundaria de consenso 1. Además, 10 secuencias únicas obtenidas en el Ejemplo 13 por secuenciación de Sanger se recogieron nuevamente y se sometieron a acortamiento a 40 mer de la misma manera.

Las secuencias acortadas se midieron en cuanto a la unión a NGF, NT-3, NT-4 mediante el método de resonancia de plasmón superficial. La medición se realizó de la misma manera que en el Ejemplo 13. Como resultado, todas las secuencias se unieron a NGF, y en particular, las siguientes 15 secuencias mostraron una fuerte unión. Por otro lado, apenas estaban ligadas a NT-3 y NT-4.

Por lo tanto, se midió la actividad inhibitoria del crecimiento de la neurita de las 15 secuencias mediante un método similar al del Ejemplo 3. Como resultado, se encontró que todos los aptámeros tenían un valor CI_{50} de no más de 1 nM (Tabla 1). Además, la actividad inhibitoria de la proliferación celular TF-1 se midió por un método similar al del Ejemplo 8 para encontrar que los aptámeros mostrados por las SEQ ID NOs: 111, 112, 114-117 tenían un valor CI_{50} de no más de 1 nM (Tabla 1).

Las secuencias de nucleótidos actualmente obtenidas, que corresponden a cada SEQ ID NO, se muestran a continuación. La SEQ ID NO: 111 es la secuencia obtenida en el Ejemplo 13 mediante secuenciación de Sanger.

SEQ ID NO: 103:

GGGU (F) C (F) C (F) U (F) GC (F) U (F) GC (F) GU (F) aGU (F) U (F) U (F) C (F) C (F) GU (F) C (F) U (F) GC (F) GU (F) GGU (F) U (F) GU (F) U (F) aC (F) C (F) C (F)

SEQ ID NO: 104:

GGGU (F) C (F) C (F) U (F) GaU (F) GU (F) C (F) aaGU (F) U (F) U (F) C (F) C (F) GU (F) C (F) U (F) U (F) GaU (F) GU (F) C (F) U (F) GU (F) U (F) aC (F) C (F) C (F)

SEQ ID NO: 105:

GGGU (F) C (F) C (F) U (F) GU (F) U (F) GC (F) U (F) aaGU (F) U (F) U (F) C (F) C (F) GU (F) C (F) U (F) U (F) aGU (F) GaC (F) U (F) GU (F) U (F) aC (F) C (F) C (F)

SEQ ID NO: 106:

GGGU (F) C (F) C (F) U (F) GC (F) U (F) GC (F) GU (F) aGU (F) U (F) U (F) C (F) C (F) GU (F) C (F) U (F) GC (F) GU (F) aGC (F) U (F) GU (F) U (F) aC (F) C (F) C (F)

SEQ ID NO: 107:

GGGU (F) C (F) C (F) U (F) GC (F) U (F) GC (F) GaaGU (F) U (F) U (F) C (F) C (F) GU (F) C (F) U (F) U (F) C (F) GU (F) GGC (F) U (F) GU (F) U (F) aC (F) C (F) C (F)

SEQ ID NO: 108:

GGGU (F) C (F) C (F) U (F) GU (F) U (F) GC (F) GU (F) aGU (F) U (F) U (F) C (F) C (F) GU (F) C (F) U (F) GC (F) GU (F) GaC (F) U (F) GU (F) U (F) aC (F) C (F) C (F)

SEQ ID NO: 109:

GGGU (F) C (F) C (F) U (F) GC (F) U (F) GC (F) GU (F) aGU (F) U (F) U (F) C (F) C (F) U (F) U (F) C (F) U (F) GC (F) GU (F) GGC (F) U (F) GU (F) U (F) aC (F) C (F) C (F)

SEQ ID NO: 110:

GGGU (F) C (F) C (F) U (F) GC (F) C (F) GC (F) GU (F) aGU (F) U (F) U (F) C (F) C (F) GU (F) C (F) U (F) GC (F) GU (F) GGC (F) U (F) GU (F) U (F) aC (F) C (F) C (F)

SEQ ID NO: 111:

GGGU (F) C (F) C (F) U (F) GU (F) C (F) U (F) aaGaGU (F) U (F) U (F) C (F) C (F) GU (F) C (F) U (F) C (F) GU (F) aGaC (F) U (F) GU (F) U (F) aC (F) C (F) C (F)

5 SEQ ID NO: 112:

GGGU (F) C (F) C (F) U (F) GU (F) U (F) C (F) aaGaGU (F) U (F) U (F) C (F) C (F) GU (F) C (F) U (F) C (F) GU (F) GGaC (F) U (F) GU (F) U (F) aC (F) C (F) C (F)

SEQ ID NO: 113:

GGGU (F) C (F) C (F) U (F) GC (F) U (F) GU (F) GU (F) aGU (F) U (F) U (F) C (F) C (F) GU (F) C (F) U (F) GC (F) aU (F) GGU (F) U (F) GU (F) U (F) aC (F) C (F) C (F)

SEQ ID NO: 114:

10 GGGU (F) C (F) C (F) U (F) GaC (F) aaaGaGU (F) U (F) U (F) C (F) C (F) GU (F) C (F) U (F) C (F) GU (F) U (F) GU (F) C (F) U (F) GU (F) U (F) aC (F) C (F) C (F)

SEQ ID NO: 115:

GGGU (F) C (F) C (F) U (F) GU (F) C (F) U (F) aaGaGU (F) U (F) U (F) C (F) C (F) GU (F) C (F) U (F) C (F) GU (F) aGaC (F) U (F) GU (F) U (F) aC (F) C (F) C (F)

SEQ ID NO: 116:

GGGU (F) C (F) C (F) U (F) GU (F) U (F) C (F) aaGaGU (F) U (F) U (F) C (F) C (F) GU (F) C (F) U (F) C (F) GU (F) GaaC (F) U (F) GU (F) U (F) aC (F) C (F) C (F)

15 SEQ ID NO: 117:

GGGU (F) C (F) C (F) U (F) GU (F) U (F) GaaGaGU (F) U (F) U (F) C (F) C (F) GU (F) C (F) U (F) C (F) GU (F) C (F) aaC (F) U (F) GU (F) U (F) aC (F) C (F) C (F)

El lado 5' de todas las secuencias de los bucles internos 1 en estos aptámeros fue CCU y el lado 3' fue UGUU. Además, el bucle 2 contenía una secuencia de consenso mostrada por 5'-UUUCCXU-3'. Aquí, X es G o U. El último par de bases del tallo 1 siempre fue U-a. Los pares de bases 8 y 9 del tallo 2 fueron a-U y G-C, respectivamente. Del 1° al 7° contuvieron algunos pares de bases diferentes.

Ejemplo 15: modificación de aptámeros acortados

Para potenciar la estabilidad del aptámero en la sangre, se prepararon variantes en las que se había sustituido la modificación en la posición 2' de la ribosa.

25 Las secuencias de las formas modificadas se muestran a continuación. Los paréntesis en los nucleótidos muestran la modificación de la posición 2', F es un átomo de flúor, M es un grupo o-metilo, y L es ácido nucleico bloqueado (LNA). La letra mayúscula muestra ARN, la letra minúscula muestra ADN, e idT significa dT invertido. El enlazador utilizado para el extremo 5' fue el ssH Linker (SAFC) o DMS (O) MT-AMINO-MODIFIER C6 (GLEN RESEARCH), y el enlazador utilizado para el extremo 3' fue TFA Amino C-6 1caa CPG (ChemGenes). PEG40GS2 es un tipo GS de 2 ramificaciones que tiene un peso molecular de 40000 (SUNBRIGHT GL2-400GS2 fabricado por NOF CORPORATION), PEG40TS2 es un tipo TS de 2 ramificaciones que tiene un peso molecular de 40000 (SUNBRIGHT GL2-400TS fabricado por NOF CORPORATION), PEG40TS4 es tipo TS de 4-ramificaciones que tiene un peso molecular de 40000 (SUNBRIGHT GL4-400TS fabricado por NOF CORPORATION), PEG80TS2 es un tipo TS de 2 ramificaciones que tiene un peso molecular de 80000 (SUNBRIGHT GL2-800TS fabricado por NOF CORPORATION), y PEG80TS4 es un tipo TS de 4 ramificaciones que tiene un peso molecular de 80000 (SUNBRIGHT GL4-800TS fabricado por NOF CORPORATION).

SEQ ID NO: 38 (1):

idT-

G (M) G (M) G (M) U (F) C (F) C (F) U (F) GC (F) U (F) G (M) C (F) G (M) U (F) aG (M) U (F) U
(F) U (F) C (F) C (F) G (M) U (F) C (F) U (F) U (F) C (F) G (M) C (F) G (M) G (M) C (F) U (F)
GU (F) U (F) aC (F) C (F) C (F) -idT

SEQ ID NO: 151:

idT-

G (M) G (M) G (M) U (F) C (F) C (F) U (F) GC (F) U (F) G (M) C (F) G (M) U (F) aG (M) U (F) U
(F) U (F) C (F) C (F) G (M) U (F) C (F) U (F) GC (F) G (M) U (F) G (M) G (M) C (F) U (F) GU (F)
U (F) aC (F) C (F) C (F) -idT

5 SEQ ID NO: 152:

idT-

G (M) G (M) G (M) U (F) C (F) C (F) U (F) GC (F) U (F) G (M) C (F) G (M) U (F) aG (M) U (F) U
(F) U (F) C (F) C (F) G (M) U (F) C (F) U (F) G (M) C (F) G (M) U (F) G (M) G (M) C (F) U (F)
GU (F) U (F) aC (F) C (F) C (F) -idT

SEQ ID NO: 153:

PEG40GS2-

G (M) G (M) G (M) U (F) C (F) C (F) U (F) GC (F) U (F) G (M) C (F) G (M) U (F) aG (M) U (F) U
(F) U (F) C (F) C (F) G (M) U (F) C (F) U (F) G (M) C (F) G (M) U (F) G (M) G (M) C (F) U (F)
GU (F) U (F) aC (F) C (F) C (F) -idT

SEQ ID NO: 154:

idT-

G (M) G (M) G (M) U (F) C (F) C (F) U (F) GC (F) U (F) G (M) C (F) G (M) U (F) aG (M) U (F) U
(F) U (F) C (F) C (F) G (M) U (F) C (F) U (F) G (M) C (F) G (M) U (F) G (M) G (M) C (F) U (F)
10 GU (F) U (F) aC (F) C (F) C (F) -PEG40GS2

SEQ ID NO: 155:

idT-

G (M) G (M) G (M) U (F) C (F) C (F) U (F) GC (F) U (F) G (M) C (F) G (M) C (F) aG (M) U (F) U
(F) U (F) C (F) C (F) G (M) U (F) C (F) U (F) aC (F) G (M) U (F) G (M) G (M) C (F) U (F) GU (F)
U (F) aC (F) C (F) C (F) -idT

SEQ ID NO: 62 (1):

idT-

G (M) G (M) G (M) U (F) C (F) C (F) U (F) GC (F) U (F) G (M) C (F) G (M) G (M) aG (M) U (F) U
(F) U (F) C (F) C (F) G (M) U (F) C (F) U (F) C (F) G (M) G (M) U (F) G (M) G (M) C (F) U (F)
15 GU (F) U (F) aC (F) C (F) C (F) -idT

SEQ ID NO: 66 (1):

idT-

G (M) G (M) G (M) U (F) C (F) C (F) U (F) GC (F) U (F) G (M) C (F) aU (F) aG (M) U (F) U (F)
U (F) C (F) C (F) G (M) U (F) C (F) U (F) U (F) U (F) G (M) U (F) G (M) G (M) C (F) U (F) GU (F)
U (F) aC (F) C (F) C (F) -idT

SEQ ID NO: 68 (1):

idT-

G (M) G (M) G (M) U (F) C (F) C (F) U (F) GaU (F) G (M) C (F) G (M) U (F) aG (M) U (F) U (F)
U (F) C (F) C (F) G (M) U (F) C (F) U (F) G (M) C (F) G (M) U (F) G (M) U (F) C (F) U (F) GU (F)
U (F) aC (F) C (F) C (F) -idT

5 SEQ ID NO: 71 (1):

idT-

G (M) G (M) G (M) U (F) C (F) C (F) U (F) GC (F) U (F) G (M) C (F) aU (F) aG (M) U (F) U (F)
U (F) C (F) C (F) G (M) U (F) C (F) U (F) G (M) U (F) G (M) U (F) G (M) G (M) C (F) U (F) GU (F)
U (F) aC (F) C (F) C (F) -idT

SEQ ID NO: 74 (1):

idT-

G (M) G (M) G (M) U (F) C (F) C (F) U (F) GC (F) U (F) G (M) C (F) aG (M) aG (M) U (F) U (F)
U (F) C (F) C (F) G (M) U (F) C (F) U (F) C (F) G (M) G (M) U (F) G (M) G (M) C (F) U (F) GU (F)
U (F) aC (F) C (F) C (F) -idT

SEQ ID NO: 76 (1):

idT-

G (M) G (M) G (M) U (F) C (F) C (F) U (F) GaU (F) U (F) aaG (M) aG (M) U (F) U (F) U (F) C (F)
C (F) C (F) G (M) U (F) C (F) U (F) C (F) G (M) U (F) aaU (F) C (F) U (F) GU (F) U (F) aC (F) C
10 (F) C (F) -idT

SEQ ID NO: 77 (1):

idT-

G (M) G (M) G (M) U (F) C (F) C (F) U (F) GaC (F) U (F) aaG (M) aG (M) U (F) U (F) U (F) C (F)
C (F) C (F) G (M) U (F) C (F) U (F) C (F) G (M) U (F) aG (M) U (F) C (F) U (F) GU (F) U (F) aC (F)
C (F) C (F) C (F) -idT

SEQ ID NO: 78 (1):

idT-

G (M) G (M) G (M) U (F) C (F) C (F) U (F) GG (M) C (F) C (F) aaG (M) aG (M) U (F) U (F) U (F)
) C (F) C (F) G (M) U (F) C (F) U (F) C (F) G (M) U (F) G (M) G (M) U (F) C (F) U (F) GU (F) U
15 (F) aC (F) C (F) C (F) -idT

SEQ ID NO: 78 (2):

idT-

G (M) G (M) G (M) U (M) C (F) C (M) U (F) GG (M) C (F) C (F) aaG (M) aG (M) U (F) U (F) U (F)
) C (F) C (M) G (M) U (M) C (F) U (F) C (M) G (M) U (M) G (M) G (M) U (M) C (M) U (F) GU (M) U
(F) aC (M) C (M) C (M) -idT

SEQ ID NO: 78 (3):

idT-

G (M) G (M) G (M) U (M) C (F) C (M) U (F) GG (M) C (M) C (M) aaG (M) aG (M) U (F) U (F) U (F)
) C (F) C (M) G (M) U (M) C (F) U (F) C (M) G (M) U (M) G (M) G (M) U (F) C (M) U (F) GU (M) U
(F) aC (M) C (M) C (M) -idT

5 SEQ ID NO: 78 (4):

idT-

G (M) G (M) G (M) U (M) C (F) C (M) U (F) GG (M) C (M) C (M) aaG (M) aG (M) U (F) U (F) U (F)
) C (F) C (M) G (M) U (M) C (F) U (F) C (M) G (M) U (M) G (M) G (M) U (M) C (M) U (F) GU (M) U
(F) aC (M) C (M) C (M) -idT

SEQ ID NO: 79 (1):

idT-

G (M) G (M) G (M) U (F) C (F) C (F) U (F) GG (M) U (F) U (F) aaG (M) aG (M) U (F) U (F) U (F)
) C (F) C (F) G (M) U (F) C (F) U (F) C (F) G (M) U (F) aaC (F) C (F) U (F) GU (F) U (F) aC (F)
) C (F) C (F) -idT

SEQ ID NO: 80 (1):

idT-

G (M) G (M) G (M) U (F) C (F) C (F) U (F) GG (M) C (F) U (F) aaG (M) aG (M) U (F) U (F) U (F)
) C (F) C (F) G (M) U (F) C (F) U (F) C (F) G (M) U (F) aG (M) U (F) C (F) U (F) GU (F) U (F)
10 aC (F) C (F) C (F) -idT

SEQ ID NO: 82 (1):

idT-

G (M) G (M) G (M) U (F) C (F) C (F) U (F) GG (M) aU (F) aaG (M) aG (M) U (F) U (F) U (F) C (F)
) C (F) C (F) G (M) U (F) C (F) U (F) C (F) G (M) U (F) aU (F) C (F) C (F) U (F) GU (F) U (F) aC (F)
) C (F) C (F) -idT

SEQ ID NO: 82 (2):

idT-

G (M) G (M) G (M) U (M) C (F) C (F) U (F) GG (M) aU (F) aaG (M) aG (M) U (F) U (F) U (F) C (F)
) C (F) C (F) G (M) U (F) C (F) U (F) C (F) G (M) U (F) aU (F) C (F) C (F) U (F) GU (F) U (F) aC (F)
15 F) C (F) C (F) -idT

SEQ ID NO: 82 (3):

idT-

G (M) G (M) G (M) U (F) C (F) C (M) U (F) GG (M) aU (F) aaG (M) aG (M) U (F) U (F) U (F) C (F) C (F) G (M) U (F) C (F) U (F) C (F) G (M) U (F) aU (F) C (F) C (F) U (F) GU (F) U (F) aC (F) C (F) C (F) -idT

SEQ ID NO: 82 (4):

idT-

G (M) G (M) G (M) U (F) C (F) C (F) U (F) GG (M) aU (M) aaG (M) aG (M) U (F) U (F) U (F) C (F) C (F) G (M) U (F) C (F) U (F) C (F) G (M) U (F) aU (F) C (F) C (F) U (F) GU (F) U (F) aC (F) C (F) C (F) -idT

5 SEQ ID NO: 82 (5):

idT-

G (M) G (M) G (M) U (F) C (F) C (F) U (F) GG (M) aU (F) aaG (M) aG (M) U (F) U (F) U (F) C (M) C (F) G (M) U (F) C (F) U (F) C (F) G (M) U (F) aU (F) C (F) C (F) U (F) GU (F) U (F) aC (F) C (F) C (F) -idT

SEQ ID NO: 82 (6):

idT-

G (M) G (M) G (M) U (F) C (F) C (F) U (F) GG (M) aU (F) aaG (M) aG (M) U (F) U (F) U (F) C (F) C (M) G (M) U (F) C (F) U (F) C (F) G (M) U (F) aU (F) C (F) C (F) U (F) GJ (F) U (F) aC (F) C (F) C (F) -idT

SEQ ID NO: 82 (7):

idT-

G (M) G (M) G (M) U (F) C (F) C (F) U (F) GG (M) aU (F) aaG (M) aG (M) U (F) U (F) U (F) C (F) C (F) G (M) U (M) C (F) U (F) C (F) G (M) U (F) aU (F) C (F) C (F) U (F) GU (F) U (F) aC (F) C (F) C (F) -idT

10

SEQ ID NO: 82 (8):

idT-

G (M) G (M) G (M) U (F) C (F) C (F) U (F) GG (M) aU (F) aaG (M) aG (M) U (F) U (F) U (F) C (F) C (F) G (M) U (F) C (F) U (M) C (F) G (M) U (F) aU (F) C (F) C (F) U (F) GU (F) U (F) aC (F) C (F) C (F) -idT

SEQ ID NO: 82 (9):

idT-

G (M) G (M) G (M) U (F) C (F) C (F) U (F) GG (M) aU (F) aaG (M) aG (M) U (F) U (F) U (F) C (F) C (F) G (M) U (F) C (F) U (F) C (M) G (M) U (F) aU (F) C (F) C (F) U (F) GU (F) U (F) aC (F) C (F) C (F) -idT

15

SEQ ID NO: 82 (10):

idT-

G (M) G (M) G (M) U (F) C (F) C (F) U (F) GG (M) aU (F) aaG (M) aG (M) U (F) U (F) U (F) C (F) C (F) G (M) U (F) C (F) U (F) C (F) G (M) U (M) aU (F) C (F) C (F) U (F) GU (F) U (F) aC (F) C (F) C (F) -idT

SEQ ID NO: 82 (11):

idT-

G (M) G (M) G (M) U (F) C (F) C (F) U (F) GG (M) aU (F) aaG (M) aG (M) U (F) U (F) U (F) C (F) C (F) G (M) U (F) C (F) U (F) C (F) G (M) U (F) aU (M) C (F) C (F) U (F) GU (F) U (F) aC (F) C (F) C (F) -idT

5 SEQ ID NO: 82 (12)

idT-

G (M) G (M) G (M) U (F) C (F) C (F) U (F) GG (M) aU (F) aaG (M) aG (M) U (F) U (F) U (F) C (F) C (F) G (M) U (F) C (F) U (F) C (F) G (M) U (F) aU (F) C (M) C (F) U (F) GU (F) U (F) aC (F) C (F) C (F) -idT

SEQ ID NO: 82 (13):

idT-

G (M) G (M) G (M) U (F) C (F) C (F) U (F) GG (M) aU (F) aaG (M) aG (M) U (F) U (F) U (F) C (F) C (F) G (M) U (F) C (F) U (F) C (F) G (M) U (F) aU (F) C (F) C (M) U (F) GU (F) U (F) aC (F) C (F) C (F) -idT

SEQ ID NO: 82 (14):

idT-

G (M) G (M) G (M) U (F) C (F) C (F) U (F) GG (M) aU (F) aaG (M) aG (M) U (F) U (F) U (F) C (F) C (F) G (M) U (F) C (F) U (F) C (F) G (M) U (F) aU (F) C (F) C (F) U (M) GU (F) U (F) aC (F) C (F) C (F) -idT

10

SEQ ID NO: 82 (15):

idT-

G (M) G (M) G (M) U (F) C (F) C (F) U (F) GG (M) aU (F) aaG (M) aG (M) U (F) U (F) U (F) C (F) C (F) G (M) U (F) C (F) U (F) C (F) G (M) U (F) aU (F) C (F) C (F) U (F) GU (M) U (F) aC (F) C (F) C (F) -idT

SEQ ID NO: 82 (16):

idT-

G (M) G (M) G (M) U (F) C (F) C (F) U (F) GG (M) aU (F) aaG (M) aG (M) U (F) U (F) U (F) C (F) C (F) G (M) U (F) C (F) U (F) C (F) G (M) U (F) aU (F) C (F) C (F) U (F) GU (F) U (F) aC (M) C (F) C (F) -idT

15

SEQ ID NO: 82 (17):

idT-

G(M)G(M)G(M)U(F)C(F)C(F)U(F)GG(M)aU(F)aaG(M)aG(M)U(F)U(F)U(F)C(F)C(F)G(M)U(F)C(F)U(F)C(F)G(M)U(F)aU(F)C(F)C(F)U(F)GU(F)U(F)aC(F)C(M)C(F)-idT

SEQ ID NO: 82 (18):

idT-

G(M)G(M)G(M)U(F)C(F)C(F)U(F)GG(M)aU(F)aaG(M)aG(M)U(F)U(F)U(F)C(F)C(F)G(M)U(F)C(F)U(F)C(F)G(M)U(F)aU(F)C(F)C(F)U(F)GU(F)U(F)aC(F)C(F)C(M)-idT

5 SEQ ID NO: 82 (19):

idT-

G(M)G(M)G(M)U(M)C(F)C(M)U(F)GG(M)aU(M)aaG(M)aG(M)U(F)U(F)U(F)C(M)C(M)G(M)U(F)C(F)U(F)C(M)G(M)U(M)aU(M)C(M)C(M)U(F)GU(M)U(F)aC(M)C(M)C(M)-idT

SEQ ID NO: 82 (20):

idT-

G(M)G(M)G(M)U(M)C(F)C(M)U(F)GG(M)aU(M)aaG(M)aG(M)U(F)U(F)U(F)C(F)C(M)G(M)U(M)C(F)U(F)C(M)G(M)U(F)aU(M)C(F)C(M)U(F)GU(M)U(F)aC(M)C(M)C(M)-idT

SEQ ID NO: 82 (21):

idT-

G(M)G(M)G(M)U(M)C(F)C(M)U(F)GG(M)aU(M)aaG(M)aG(M)U(F)U(F)U(F)C(F)C(M)G(M)U(M)C(F)U(F)C(F)G(M)U(M)aU(M)C(F)C(M)U(F)GU(M)U(F)aC(M)C(M)C(M)-idT

10

SEQ ID NO: 82 (22):

idT-

G(M)G(M)G(M)U(M)C(F)C(M)U(F)GG(M)aU(M)aaG(M)aG(M)U(F)U(F)U(F)C(F)C(M)G(M)U(M)C(F)U(F)C(M)G(M)U(M)aU(M)C(F)C(M)U(F)GU(M)U(F)aC(M)C(M)C(M)-idT

SEQ ID NO: 82 (23):

idT-

G(M)G(M)G(M)U(M)C(F)C(M)U(F)GG(M)aU(M)aaG(M)aG(M)U(F)U(F)U(F)C(F)C(M)G(M)U(M)C(F)U(F)C(M)G(M)U(F)aU(M)C(M)C(M)U(F)GU(M)U(F)aC(M)C(M)C(M)-idT

15

SEQ ID NO: 82 (24):

idT-

G (M) G (M) G (M) U (M) C (F) C (M) U (F) GG (M) aU (M) aaG (M) aG (M) U (F) U (F) U (F) C (F) C (M) G (M) U (M) C (F) U (F) C (F) G (M) U (M) aU (M) C (M) C (M) U (F) GU (M) U (F) aC (M) C (M) C (M) -idT

SEQ ID NO: 82 (25):

idT-

G (M) G (M) G (M) U (M) C (F) C (M) U (F) GG (M) aU (M) aaG (M) aG (M) U (F) U (F) U (F) C (F) C (M) G (M) U (M) C (F) U (F) C (M) G (M) U (M) aU (M) C (M) C (M) U (F) GU (M) U (F) aC (M) C (M) C (M) -idT

5 SEQ ID NO: 82 (26):

idT-

G (M) G (M) G (M) U (M) C (F) C (M) U (F) GG (M) aU (M) aaG (M) aG (M) U (F) U (F) U (F) C (M) C (M) G (M) U (M) C (F) U (F) C (M) G (M) U (M) aU (M) C (M) C (M) U (F) GU (M) U (F) aC (M) C (M) C (M) -idT

SEQ ID NO: 82 (27):

idT-

G (M) G (M) G (M) U (F) cC (F) U (F) GG (M) aU (F) aaG (M) aG (M) U (F) U (F) U (F) C (F) C (F) G (M) U (F) C (F) U (F) C (F) G (M) U (F) aU (F) C (F) C (F) U (F) GU (F) U (F) aC (F) C (F) C (F) -idT

SEQ ID NO: 156:

idT-

G (M) G (M) G (M) U (F) C (F) C (F) U (F) GG (M) aU (F) aaG (M) aG (M) tU (F) U (F) C (F) C (F) G (M) U (F) C (F) U (F) C (F) G (M) U (F) aU (F) C (F) C (F) U (F) GU (F) U (F) aC (F) C (F) C (F) -idT

10

SEQ ID NO: 157:

idT-

G (M) G (M) G (M) U (F) C (F) C (F) U (F) GG (M) aU (F) aaG (M) aG (M) U (F) tU (F) C (F) C (F) G (M) U (F) C (F) U (F) C (F) G (M) U (F) aU (F) C (F) C (F) U (F) GU (F) U (F) aC (F) C (F) C (F) -idT

SEQ ID NO: 82 (30):

idT-

G (M) G (M) G (M) U (F) C (F) C (F) U (F) GG (M) aU (F) aaG (M) aG (M) U (F) U (F) U (F) cC (F) G (M) U (F) C (F) U (F) C (F) G (M) U (F) aU (F) C (F) C (F) U (F) GU (F) U (F) aC (F) C (F) C (F) -idT

15

SEQ ID NO: 82 (31):

idT-

G (M) G (M) G (M) U (F) C (F) C (F) U (F) GG (M) aU (F) aaG (M) aG (M) U (F) U (F) U (F) C (F) C (F) G (M) U (F) cU (F) C (F) G (M) U (F) aU (F) C (F) C (F) U (F) GU (F) U (F) aC (F) C (F) C (F) -idT

SEQ ID NO: 158:

idT-

G (M) G (M) G (M) U (F) C (F) C (F) U (F) GG (M) aU (F) aaG (M) aG (M) U (F) U (F) U (F) C (F) C (F) G (M) U (F) C (F) U (F) C (F) G (M) U (F) aU (F) C (F) C (F) tGU (F) U (F) aC (F) C (F) C (F) -idT

5 SEQ ID NO: 159:

idT-

G (M) G (M) G (M) U (F) C (F) C (F) U (F) GG (M) aU (F) aaG (M) aG (M) U (F) U (F) U (F) C (F) C (F) G (M) U (F) C (F) U (F) C (F) G (M) U (F) aU (F) C (F) C (F) U (F) GU (F) taC (F) C (F) C (F) -idT

SEQ ID NO: 160:

idT-

G (M) G (M) G (M) U (M) C (F) C (M) U (F) GG (M) aU (M) aaG (M) aG (M) tU (F) U (F) C (F) C (M) G (M) U (M) C (F) U (F) C (M) G (M) U (M) aU (M) C (M) C (M) U (F) GU (M) U (F) aC (M) C (M) C (M) -idT

SEQ ID NO: 161:

idT-

G (M) G (M) G (M) U (M) C (F) C (M) U (F) GG (M) aU (M) aaG (M) aG (M) U (F) U (F) U (F) C (F) C (M) G (M) U (M) C (F) U (F) C (M) G (M) U (M) aU (M) C (M) C (M) tGU (M) U (F) aC (M) C (M) C (M) -idT

10

SEQ ID NO: 162:

idT-

G (M) G (M) G (M) U (M) C (F) C (M) U (F) GG (M) aU (M) aaG (M) aG (M) tU (F) U (F) C (F) C (M) G (M) U (M) C (F) U (F) C (M) G (M) U (M) aU (M) C (M) C (M) tGU (M) U (F) aC (M) C (M) C (M) -idT

SEQ ID NO: 82 (37):

idT-

G (M) G (M) G (M) U (M) C (F) C (M) uGG (M) aU (M) aaG (M) aG (M) U (F) U (F) U (F) C (F) C (M) G (M) U (M) C (F) U (F) C (M) G (M) U (M) aU (M) C (M) C (M) U (F) GU (M) U (F) aC (M) C (M) C (M) -idT

15

SEQ ID NO: 82 (38):

idT-

G (M) G (M) G (M) U (M) C (F) C (M) U (F) GG (M) aU (M) aaG (M) aG (M) U (F) uU (F) C (F) C
(M) G (M) U (M) C (F) U (F) C (M) G (M) U (M) aU (M) C (M) C (M) U (F) GU (M) U (F) aC (M) C
(M) C (M) -idT

SEQ ID NO: 82 (39):

idT-

G (M) G (M) G (M) U (M) C (F) C (M) U (F) GG (M) aU (M) aaG (M) aG (M) U (F) U (F) uC (F) C
(M) G (M) U (M) C (F) U (F) C (M) G (M) U (M) aU (M) C (M) C (M) U (F) GU (M) U (F) aC (M) C
(M) C (M) -idT

5 SEQ ID NO: 82 (40):

idT-

G (M) G (M) G (M) U (M) C (F) C (M) U (F) GG (M) aU (M) aaG (M) aG (M) U (F) U (F) U (F) C (F)
C (M) G (M) U (M) C (F) uC (M) G (M) U (M) aU (M) C (M) C (M) U (F) GU (M) U (F) aC (M) C
(M) C (M) -idT

SEQ ID NO: 82 (41):

idT-

G (M) G (M) G (M) U (M) C (F) C (M) U (F) GG (M) aU (M) aaG (M) aG (M) U (F) U (F) U (F) C (F)
C (M) G (M) U (M) C (F) U (F) C (M) G (M) U (M) aU (M) C (M) C (M) U (F) GU (M) uaC (M) C
(M) C (M) -idT

SEQ ID NO: 82 (42):

idT-

G (M) G (M) G (M) U (M) C (F) C (M) U (F) GG (M) aU (M) aaG (M) A (M) G (M) U (F) U (F) U (F)
) C (F) C (M) G (M) U (M) C (F) U (F) C (M) G (M) U (M) aU (M) C (M) C (M) U (F) GU (M) U (F)
aC (M) C (M) C (M) -idT

10

SEQ ID NO: 82 (43):

idT-

G (M) G (M) G (M) U (M) C (F) C (M) U (F) GG (M) aU (M) aaG (M) A (M) G (M) aG (M) U (F) U (F) U (F)
) C (F) C (M) G (M) U (M) C (F) U (F) C (M) G (M) U (M) aU (M) C (M) C (M) U (F) GU (M) U (F)
aC (M) C (M) C (M) -idT

SEQ ID NO: 82 (44):

idT-

G (M) G (M) G (M) U (M) C (F) C (M) U (F) GG (M) aU (M) A (M) aG (M) aG (M) U (F) U (F) U (F)
) C (F) C (M) G (M) U (M) C (F) U (F) C (M) G (M) U (M) aU (M) C (M) C (M) U (F) GU (M) U (F)
aC (M) C (M) C (M) -idT

15

SEQ ID NO: 82 (45):

idT-

G (M) G (M) G (M) U (M) C (F) C (M) U (F) GG (M) A (M) U (M) aaG (M) aG (M) U (F) U (F) U (F) U (F)
) C (F) C (M) G (M) U (M) C (F) U (F) C (M) G (M) U (M) aU (M) C (M) C (M) U (F) GU (M) U (F)
aC (M) C (M) C (M) -idT

SEQ ID NO: 82 (46):

idT-

G (M) G (M) G (M) U (M) C (F) C (M) U (F) GG (M) aU (M) aaG (M) aG (M) U (F) U (F) U (F) C (F)
) C (M) G (M) U (M) C (F) U (F) C (M) G (M) U (M) A (M) U (M) C (M) C (M) U (F) GU (M) U (F)
aC (M) C (M) C (M) -idT

5 SEQ ID NO: 82 (47):

idT-

G (M) G (M) G (M) U (M) C (F) C (M) U (F) GG (M) aU (M) aaG (M) aG (M) U (F) U (F) U (F) C (F)
) C (M) G (M) U (M) C (F) U (F) C (M) G (M) U (M) aU (M) C (M) C (M) U (F) GU (M) U (F) A (M)
) C (M) C (M) C (M) -idT

SEQ ID NO: 82 (48):

idT-

G (M) G (M) G (M) U (M) C (F) C (M) U (F) GG (M) A (M) U (M) aaG (M) A (M) G (M) U (F) U (F)
U (F) C (F) C (M) G (M) U (M) C (F) U (F) C (M) G (M) U (M) A (M) U (M) C (M) C (M) U (F) GU (M)
) U (F) A (M) C (M) C (M) C (M) -idT

SEQ ID NO: 163:

idT-

G (M) G (M) G (M) U (M) C (F) C (M) U (F) GG (M) aU (M) aaG (M) aG (M) tU (F) U (F) C (F) C (M)
) (M) G (M) U (M) C (F) U (F) C (M) G (M) U (M) aU (M) C (M) C (M) tGU (M) uaC (M) C (M) C (M)
) -idT

10

SEQ ID NO: 164:

idT-

G (M) G (M) G (M) U (M) C (F) C (M) uGG (M) aU (M) aaG (M) aG (M) tU (F) U (F) C (F) C (M)
G (M) U (M) C (F) U (F) C (M) G (M) U (M) aU (M) C (M) C (M) tGU (M) U (F) aC (M) C (M) C (M)
) -idT

SEQ ID NO: 165:

idT-

G (M) G (M) G (M) U (M) C (F) C (M) U (F) GG (M) aU (M) aaG (M) aG (M) tU (F) U (F) C (F) C (M)
) (M) G (M) U (M) C (F) U (F) C (M) G (M) U (M) aU (M) C (M) C (M) tGU (M) uA (M) C (M) C (M)
C (M) -idT

15

SEQ ID NO: 166:

idT-

G (M) G (M) G (M) U (M) C (F) C (M) U (F) GG (M) A (M) U (M) aaG (M) A (M) G (M) tU (F) U (F)
) C (F) C (M) G (M) U (M) C (F) U (F) C (M) G (M) U (M) A (M) U (M) C (M) C (M) tGU (M) uA (M)
) C (M) C (M) C (M) -idT

SEQ ID NO: 167:

idT-

G (M) G (M) G (M) U (M) C (F) C (M) U (F) GG (M) A (M) U (M) aaG (M) A (M) G (M) tU (F) U (F)
) C (F) C (M) G (M) U (M) C (F) U (F) C (M) G (M) U (M) A (M) U (M) C (M) C (M) tGU (M) U (F)
A (M) C (M) C (M) C (M) -idT

5 SEQ ID NO: 168:

idT-

G (M) G (M) G (M) U (M) C (F) C (M) uGG (M) A (M) U (M) aaG (M) A (M) G (M) tU (F) U (F) C (F)
) C (M) G (M) U (M) C (F) U (F) C (M) G (M) U (M) A (M) U (M) C (M) C (M) tGU (M) uA (M) C (M)
) C (M) C (M) C (M) -idT

SEQ ID NO: 82 (55):

PEG80TS4-

G (M) G (M) G (M) U (M) C (F) C (M) U (F) GG (M) aU (M) aaG (M) aG (M) U (F) U (F) U (F) C (F)
) C (M) G (M) U (M) C (F) U (F) C (M) G (M) U (M) aU (M) C (M) C (M) U (F) GU (M) U (F) aC (M)
) C (M) C (M) C (M) -idT

SEQ ID NO: 82 (56):

PEG40GS2-

G (M) G (M) G (M) U (F) C (F) C (F) U (F) GG (M) aU (F) aaG (M) aG (M) U (F) U (F) U (F) C (F)
) C (F) G (M) U (F) C (F) U (F) C (F) G (M) U (F) aU (F) C (F) C (F) U (F) GU (F) U (F) aC (F)
) C (F) C (F) C (F) -idT

10

SEQ ID NO: 82 (57):

G (M) G (M) G (M) U (M) C (F) C (M) U (F) sGG (M) A (M) U (M) aaG (M) A (M) G (M) U (F) U (F)
) U (F) C (F) C (M) G (M) U (M) C (F) U (F) C (M) G (M) U (M) A (M) U (M) C (M) C (M) U (F) GU
(M) U (F) A (M) C (M) C (M) C (M) -idT

SEQ ID NO: 82 (58):

G (M) G (M) G (M) U (M) C (F) C (M) U (F) GsG (M) A (M) U (M) aaG (M) A (M) G (M) U (F) U (F)
) U (F) C (F) C (M) G (M) U (M) C (F) U (F) C (M) G (M) U (M) A (M) U (M) C (M) C (M) U (F) GU
(M) U (F) A (M) C (M) C (M) C (M) -idT

15

SEQ ID NO: 82 (59):

G (M) G (M) G (M) U (M) C (F) C (M) U (F) GG (M) A (M) U (M) saaG (M) A (M) G (M) U (F) U (F)
) U (F) C (F) C (M) G (M) U (M) C (F) U (F) C (M) G (M) U (M) A (M) U (M) C (M) C (M) U (F) GU
(M) U (F) A (M) C (M) C (M) C (M) -idT

SEQ ID NO: 82 (60):

G (M) G (M) G (M) U (M) C (F) C (M) U (F) GG (M) A (M) U (M) asaG (M) A (M) G (M) U (F) U (F)
) U (F) C (F) C (M) G (M) U (M) C (F) U (F) C (M) G (M) U (M) A (M) U (M) C (M) C (M) U (F) GU
(M) U (F) A (M) C (M) C (M) C (M) -idT

SEQ ID NO: 82 (61):

G (M) G (M) G (M) U (M) C (F) C (M) U (F) GG (M) A (M) U (M) aasG (M) A (M) G (M) U (F) U (F)
) U (F) C (F) C (M) G (M) U (M) C (F) U (F) C (M) G (M) U (M) A (M) U (M) C (M) C (M) U (F) GU
(M) U (F) A (M) C (M) C (M) C (M) -idT

5 SEQ ID NO: 82 (62):

G (M) G (M) G (M) U (M) C (F) C (M) U (F) GG (M) A (M) U (M) aaG (M) A (M) G (M) U (F) U (F)
U (F) C (F) C (M) G (M) U (M) C (F) U (F) C (M) G (M) U (M) A (M) U (M) C (M) C (M) U (F) sGU
(M) U (F) A (M) C (M) C (M) C (M) -idT

SEQ ID NO: 82 (63):

G (M) G (M) G (M) U (M) C (F) C (M) U (F) GG (M) A (M) U (M) aaG (M) A (M) G (M) U (F) U (F)
U (F) C (F) C (M) G (M) U (M) C (F) U (F) C (M) G (M) U (M) A (M) U (M) C (M) C (M) U (F) GsU
(M) U (F) A (M) C (M) C (M) C (M) -idT

SEQ ID NO: 82 (64):

PEG40TS2-

G (M) G (M) G (M) U (M) C (F) C (M) U (F) GG (M) aU (M) aaG (M) aG (M) U (F) U (F) U (F) C (F)
C (M) G (M) U (M) C (F) U (F) C (M) G (M) U (M) aU (M) C (M) C (M) U (F) GU (M) U (F) aC (M)
C (M) C (M) -idT

10

SEQ ID NO: 87 (1):

idT-

G (M) G (M) G (M) U (F) C (F) C (F) U (F) GC (F) U (F) C (F) aaGaGU (F) U (F) U (F) C (F) C
(F) GU (F) C (F) U (F) C (F) GU (F) GGGC (F) U (F) GU (F) U (F) aC (M) C (M) C (M) -idT

SEQ ID NO: 87 (2):

idT-

G (M) G (M) G (M) U (M) C (F) C (M) U (F) GC (F) U (F) C (F) aaG (M) aG (M) U (F) U (F) U (F)
) C (F) C (M) G (M) U (M) C (F) U (F) C (M) G (M) U (M) GGGC (M) U (F) GU (M) U (F) aC (M) C
(M) C (M) -idT

15 SEQ ID NO: 87 (3):

idT-

G (M) G (M) G (M) U (M) C (F) C (M) U (F) GC (F) U (F) C (F) aaG (M) aG (M) U (F) U (F) U (F)
) C (F) C (M) G (M) U (M) C (F) U (F) C (M) G (M) U (M) G (M) G (M) G (M) C (M) U (F) GU (M) U
(F) aC (M) C (M) C (M) -idT

SEQ ID NO: 87 (4):

idT-

G (M) G (M) G (M) U (M) C (F) C (M) U (F) GC (M) U (M) C (M) aaG (M) aG (M) U (F) U (F) U (F)
) C (F) C (M) G (M) U (M) C (F) U (F) C (M) G (M) U (M) G (M) G (M) G (M) C (M) U (F) GU (M) U
 (F) aC (M) C (M) C (M) -idT

SEQ ID NO: 87 (5):

G (M) G (M) G (M) U (M) C (F) C (M) U (F) GC (M) U (M) C (M) aaG (M) A (M) G (M) U (F) U (F)
 U (F) C (F) C (M) G (M) U (M) C (F) U (F) C (M) G (M) U (M) G (M) G (M) G (M) C (M) U (F) GU (M)
 U (F) A (M) C (M) C (M) C (M) -idT

5 SEQ ID NO: 88 (1):

idT-

GGGU (F) C (F) C (F) U (F) GU (F) U (F) C (F) aaGaGU (F) U (F) U (F) C (F) C (F) GU (F) C
 (F) U (F) C (F) GU (F) GaaC (F) U (F) GU (F) U (F) aC (M) C (M) C (M) -idT

SEQ ID NO: 88 (2):

idT-

G (M) G (M) G (M) U (F) C (F) C (F) U (F) GU (F) U (F) C (F) aaGaGU (F) U (F) U (F) C (F) C
 (F) GU (F) C (F) U (F) C (F) GU (F) GaaC (F) U (F) GU (F) U (F) aC (M) C (M) C (M) -idT

SEQ ID NO: 88 (3):

idT-

G (M) G (M) G (M) U (M) C (F) C (M) U (F) GU (F) U (F) C (F) aaG (M) aG (M) U (F) U (F) U (F)
) C (F) C (M) G (M) U (M) C (F) U (F) C (M) G (M) U (M) GaaC (M) U (F) GU (M) U (F) aC (M) C
 10 (M) C (M) -idT

SEQ ID NO: 88 (4):

idT-

G (M) G (M) G (M) U (M) C (F) C (M) U (F) GU (M) U (M) C (M) aaG (M) aG (M) U (F) U (F) U (F)
) C (F) C (M) G (M) U (M) C (F) U (F) C (M) G (M) U (M) G (M) aaC (M) U (F) GU (M) U (F) aC (M)
 C (M) C (M) -idT

SEQ ID NO: 89 (1):

idT-

G (M) G (M) G (M) U (F) C (F) C (F) U (F) GU (F) GGaaGaGU (F) U (F) U (F) C (F) C (F) GU (F)
 15 F) C (F) U (F) C (F) GU (F) C (F) C (F) aC (F) U (F) GU (F) U (F) aC (M) C (M) C (M) -idT

SEQ ID NO: 89 (2):

idT-

G (M) G (M) G (M) U (F) C (F) C (M) U (F) GU (F) GGaaG (M) aG (M) U (F) U (F) U (F) C (F) C
 (M) G (M) U (M) C (F) U (F) C (M) G (M) U (M) C (F) C (F) aC (M) U (F) GU (M) U (F) aC (M) C
 (M) C (M) -idT

SEQ ID NO: 89 (3):

idT-

G (M) G (M) G (M) U (F) C (F) C (M) U (F) GU (F) G (M) G (M) aaG (M) aG (M) U (F) U (F) U (F)
) C (F) C (M) G (M) U (M) C (F) U (F) C (M) G (M) U (M) C (F) C (F) aC (M) U (F) GU (M) U (F)
 aC (M) C (M) C (M) -idT

SEQ ID NO: 89 (4):

idT-

G (M) G (M) G (M) U (F) C (F) C (M) U (F) GU (M) G (M) G (M) aaG (M) aG (M) U (F) U (F) U (F)
) C (F) C (M) G (M) U (M) C (F) U (F) C (M) G (M) U (M) C (M) C (M) aC (M) U (F) GU (M) U (F)
 aC (M) C (M) C (M) -idT

5 SEQ ID NO: 89 (5):

G (M) G (M) G (M) U (M) C (F) C (M) U (F) GU (M) G (M) G (M) aaG (M) A (M) G (M) U (F) U (F)
 U (F) C (F) C (M) G (M) U (M) C (F) U (F) C (M) G (M) U (M) C (M) C (M) A (M) C (M) U (F) GU (M)
 U (F) A (M) C (M) C (M) C (M) -idT

SEQ ID NO: 111 (1):

G (M) G (M) G (M) U (M) C (F) C (M) U (F) GU (M) C (M) U (M) aaG (M) A (M) G (M) U (F) U (F)
 U (F) C (F) C (M) G (M) U (M) C (F) U (F) C (M) G (M) U (M) A (M) G (M) A (M) C (M) U (F) GU (M)
 M) U (F) A (M) C (M) C (M) C (M) -idT

10 La actividad de unión del ARN indicado por la SEQ ID NO: 82 (2) a NGF, NT-3, NT-4 se midió mediante el método de resonancia de plasmón superficial de la misma manera que en el Ejemplo 13. Como resultado, se encontró que el ARN tenía una actividad de unión a cualquier proteína (Fig. 3). Además, se examinó si el aptámero mostrado por SEQ ID NO: 82 (2) inhibía la unión de NGF y su receptor (TrkA o p75) de la misma manera que en el Ejemplo 2 mediante el método de resonancia de plasmón superficial. Como resultado, se descubrió que el aptámero inhibía fuertemente la unión del NGF a los dos receptores (Figs. 4 y 5).

15 La actividad inhibidora de crecimiento de la neurita de todas las formas modificadas antes mencionadas se midió por un método similar al del Ejemplo 3. Como resultado, el valor de Cl_{50} de todas las formas modificadas que no eran la SEQ ID NO: 62 (1) no fue más de 1 nM (Tabla 1). En particular, el valor de Cl_{50} del aptámero que se indica por la SEQ ID NO: 162 fue 0,033 nM. Por otra parte, la actividad inhibidora de la proliferación celular de TF-1 se midió por un método similar al del Ejemplo 8 para encontrar que casi todos los aptámeros tenían un valor de Cl_{50} de no más de 1 nM (Tabla 1). En particular, el valor de Cl_{50} del aptámero que se indica por la SEQ ID NO: 162 fue 0,014 nM. El valor de Cl_{50} del aptámero que se indica por la SEQ ID NO: 62 (1) fue de 0,49 nM.

A partir de lo anterior, se demostró que los aptámeros pueden mantener la actividad inhibidora incluso cuando la modificación en la posición 2' de la ribosa se cambia.

[Tabla 1-1]

	base	inhibición del crecimiento de la neurita	inhibición de la proliferación celular
		Cl_{50}	Cl_{50}
SEQ ID NO: 76	40	<0,3	<0,3
SEQ ID NO: 77	40	<0,3	<0,3
SEQ ID NO: 78	40	<0,3	<0,3

ES 2 687 154 T3

	base	inhibición del crecimiento de la neurita	inhibición de la proliferación celular
		CI ₅₀	CI ₅₀
SEQ ID NO: 79	40	<0,3	<0,3
SEQ ID NO: 80	40	<0,3	<0,3
SEQ ID NO: 81	40	0,765	6,924
SEQ ID NO: 82	40	<0,3	<0,3
SEQ ID NO: 83	40	<0,3	<0,3
SEQ ID NO: 84	40	0,793	>10
SEQ ID NO: 85	40	<0,3	0,311
SEQ ID NO: 86	40	0,834	>10
SEQ ID NO: 88	40	0,572	0,979
SEQ ID NO: 89	40	0,959	>1
SEQ ID NO: 76 (1)	40	0,117	0,013

[Tabla 1-2]

SEQ ID NO: 77 (1)	40	0,126	0,013
SEQ ID NO: 78 (1)	40	0,12	0,018
SEQ ID NO: 79 (1)	40	0,289	<0,03
SEQ ID NO: 80 (1)	40	0,271	0,03
SEQ ID NO: 82 (1)	40	0,7	0,012
SEQ ID NO: 87 (1)	40	0,173	<0,1
SEQ ID NO: 87 (2)	40	0,107	<0,1
SEQ ID NO: 87 (3)	40	0,118	<0,1
SEQ ID NO: 87 (4)	40	0,113	<0,1
SEQ ID NO: 87 (5)	40	0,078	0,178
SEQ ID NO: 88 (1)	40	0,241	<0,1
SEQ ID NO: 88 (2)	40	0,241	<0,1
SEQ ID NO: 88 (3)	40	0,106	<0,1

ES 2 687 154 T3

SEQ ID NO: 88 (4)	40	0,111	<0,1
SEQ ID NO: 89 (1)	40	0,246	<0,1
SEQ ID NO: 89 (2)	40	0,103	<0,1
SEQ ID NO: 89 (3)	40	0,122	<0,1
SEQ ID NO: 89 (4)	40	<0,1	<0,1
SEQ ID NO: 89 (5)	40	0,079	> 0,3
SEQ ID NO: 82 (2)	40	0,145	0,041
SEQ ID NO: 82 (3)	40	0,255	0,051
SEQ ID NO: 82 (4)	40	0,139	0,036
SEQ ID NO: 82 (5)	40	0,269	0,075
SEQ ID NO: 82 (6)	40	0,128	0,034
SEQ ID NO: 82 (7)	40	0,143	0,030
SEQ ID NO: 82 (8)	40	0,284	0,071
SEQ ID NO: 82 (9)	40	0,252	0,035
SEQ ID NO: 82 (10)	40	0,128	0,033
SEQ ID NO: 82 (11)	40	0,253	0,046
SEQ ID NO: 82 (12)	40	0,127	0,027
SEQ ID NO: 82 (13)	40	0,146	0,034
SEQ ID NO: 82 (14)	40	0,294	>0,1
SEQ ID NO: 82 (15)	40	0,127	0,043
SEQ ID NO: 82 (16)	40	0,129	0,026
SEQ ID NO: 82 (17)	40	0,127	0,025
SEQ ID NO: 82 (18)	40	0,244	0,028
SEQ ID NO: 82 (19)	40	0,291	>0,1
SEQ ID NO: 82 (20)	40	0,244	0,031
SEQ ID NO: 82 (21)	40	<0,1	0,085
SEQ ID NO: 82 (22)	40	<0,1	0,083
SEQ ID NO: 82 (23)	40	<0,1	0,084

ES 2 687 154 T3

SEQ ID NO: 82 (24)	40	<0,1	0,084
SEQ ID NO: 82 (25)	40	<0,1	0,085
SEQ ID NO: 82 (26)	40	0,13	0,087
SEQ ID NO: 82 (27)	40	0,25	0,093
SEQ ID NO: 156	40	<0,1	0,085
SEQ ID NO: 157	40	0,299	>0,1
SEQ ID NO: 82 (30)	40	0,244	>0,1
SEQ ID NO: 82 (31)	40	0,276	>0,1
SEQ ID NO: 158	40	0,1	<0,03
SEQ ID NO: 159	40	0,264	>0,1
SEQ ID NO: 160	40	0,038	0,016

[Tabla 1-3]

SEQ ID NO: 161	40	0,036	0,015
SEQ ID NO: 162	40	0,033	0,014
SEQ ID NO: 82 (37)	40	0,098	0,097
SEQ ID NO: 82 (38)	40	0,295	>0,1
SEQ ID NO: 82 (39)	40	0,256	>0,1
SEQ ID NO: 82 (40)	40	0,239	0,073
SEQ ID NO: 82 (41)	40	0,084	0,042
SEQ ID NO: 82 (42)	40	0,037	0,021
SEQ ID NO: 82 (43)	40	0,088	>0,1
SEQ ID NO: 82 (44)	40	0,097	>0,1
SEQ ID NO: 82 (45)	40	0,037	0,024
SEQ ID NO: 82 (46)	40	0,033	0,022
SEQ ID NO: 82 (47)	40	0,046	0,022
SEQ ID NO: 78 (2)	40	0,045	0,016
SEQ ID NO: 78 (3)	40	0,045	0,015

ES 2 687 154 T3

SEQ ID NO: 78 (4)	40	0,037	0,021
SEQ ID NO: 82 (48)	40	0,252	0,056
SEQ ID NO: 163	40	0,113	0,047
SEQ ID NO: 164	40	0,132	0,048
SEQ ID NO: 165	40	0,139	0,039
SEQ ID NO: 166	40	0,113	0,037
SEQ ID NO: 167	40	0,128	0,037
SEQ ID NO: 168	40	0,261	>0,1
SEQ ID NO: 82 (55)	40	0,101	0,039
SEQ ID NO: 82 (56)	40	0,067	0,023
SEQ ID NO: 82 (57)	40	0,045	>0,3
SEQ ID NO: 82 (58)	40	0,072	>0,3
SEQ ID NO: 82 (59)	40	0,034	>0,3
SEQ ID NO: 82 (60)	40	0,034	0,081
SEQ ID NO: 82 (61)	40	0,031	>0,3
SEQ ID NO: 82 (62)	40	0,039	>0,3
SEQ ID NO: 82 (63)	40	0,046	0,266
SEQ ID NO: 82 (64)	40	0,107	0,036
SEQ ID NO: 111 (1)	40	0,060	>0,3
SEQ ID NO: 101	40	0,994	>1
SEQ ID NO: 102	40	0,908	>1
SEQ ID NO: 103	40	0,766	>1
SEQ ID NO: 104	40	0,682	>1
SEQ ID NO: 105	40	0,444	>1
SEQ ID NO: 106	40	0,770	>1
SEQ ID NO: 107	40	0,967	>1
SEQ ID NO: 108	40	0,403	>1
SEQ ID NO: 109	40	0,687	>1

SEQ ID NO: 110	40	0,999	>1
SEQ ID NO: 111	40	0,252	0,363
SEQ ID NO: 112	40	0,334	0,193
SEQ ID NO: 113	40	0,960	>1
SEQ ID NO: 114	40	0,363	0,296
SEQ ID NO: 115	40	0,298	0,183
SEQ ID NO: 116	40	0,411	0,322
SEQ ID NO: 117	40	0,394	0,455

Ejemplo 16: confirmación de reactividad cruzada con otras neurotrofinas mediante un ensayo de inhibición de la proliferación celular de TF-1

5 Usando células TF-1, se examinó si el aptámero de NGF inhibía BDNF, NT-3, y NT-4. Se introdujeron genes de
receptores humanos (TrkB, TrkC, p75) para los respectivos factores neurotróficos en células TF-1 (Número ATCC:
CRL-2003), que es una línea celular eritroleucémica humana, usando un vector de retrovirus para dar células que
expresan altamente estos receptores de forma estable. Las células TF-1 introducidas con TrkB y p75 se usaron para
la evaluación de la actividad inhibitoria frente a BDNF, las células TF-1 introducidas con TrkC y p75 se usaron para
10 la evaluación frente a NT-3, y las células TF-1 introducidas con TrkB solo se usaron para la evaluación frente a NT-
4. Estas células se suspendieron en un medio RPMI-1640 que contenía un 20% de suero bovino fetal, y se
sembraron en una placa blanca de fondo plano de 96 pocillos a 1000 células (50 µl) por pocillo. A esto se añadió una
solución mixta de 50 µl de BDNF humano (concentración final 0,074 nM) o NT-3 (concentración final 0,074 nM) o
15 NT-4 (concentración final 0,071 nM) y el aptámero (concentración final 1 µM-0,01 nM), que había reaccionado
previamente a temperatura ambiente durante 30 minutos en un medio RPMI-1640 libre de suero, 3 días más tarde,
se añadieron 100 µl de reactivo CellTiter-Glo para el ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter-Glo
(fabricado por Promega) a cada uno, la quimioluminiscencia se midió mediante un lector de microplacas. Con la
cantidad de luminiscencia por pocillo obtenida mediante la adición de BDNF o NT-3 o NT-4 solos y cultivo de las
células durante 3 días como actividad inhibitoria 0%, y la del pocillo obtenido por cultivo durante 3 días sin adición de
20 BDNF o NT-3 o NT-4 como actividad inhibitoria al 100%, la actividad inhibitoria del aptámero se calculó a partir de la
cantidad de luminiscencia por pocillo obtenida mediante cultivo con la adición de BDNF o NT-3 o NT-4 y el aptámero
en mezcla. Cuando la actividad inhibitoria fue 0 o inferior, se indica "0%". La concentración inhibitoria del 50% (CI₅₀)
se determinó a partir de las concentraciones en dos puntos, por encima y por debajo, intercalando la actividad
inhibitoria del 50%. Los resultados del experimento se muestran en la Tabla 2. Un valor de CI₅₀ indicado como ">X"
25 significa que la actividad inhibitoria no fue más del 50% cuando la concentración X indicada era la concentración
máxima medida. ND significa no medido.

Todos los aptámeros ensayados mostraron una fuerte actividad inhibitoria. Los valores CI₅₀ de los mismos se
muestran parcialmente en la Tabla 2. En cuanto a la actividad inhibitoria de los aptámeros de la presente invención
descrita en la Tabla 2, el valor de CI₅₀ para NGF no fue más de 0,1 nM, mientras que para BDNF no fue menor de
1000 nM. El valor de CI₅₀ para NT-3 varió de 0,97 nM a no menos de 10 nM dependiendo del aptámero. El valor de
30 CI₅₀ para NT-4 varió desde no más de 3 nM a no menos de 30 nM dependiendo del aptámero.

Tabla 2

Actividad inhibitoria del aptámero de NGF frente a otras neurotrofinas

	BDNF (CI ₅₀)	NT3 (CI ₅₀)	NT4 (CI ₅₀)	NGF (CI ₅₀)
SEQ ID NO: 78 (4)	ND	3	<100	0,021
SEQ ID NO: 82 (2)	ND	40,60	<3	0,041
SEQ ID NO: 82 (3)	ND	42,05	9,36	0,051

ES 2 687 154 T3

Actividad inhibidora del aptámero de NGF frente a otras neurotrofinas

	BDNF (CI ₅₀)	NT3 (CI ₅₀)	NT4 (CI ₅₀)	NGF (CI ₅₀)
SEQ ID NO: 82 (4)	ND	30,39	3,37	0,036
SEQ ID NO: 82 (5)	ND	51,23	<3	0,075
SEQ ID NO: 82 (6)	ND	<30	<3	0,034
SEQ ID NO: 82 (7)	ND	<30	3,74	0,030
SEQ ID NO: 82 (9)	ND	34,80	<3	0,035
SEQ ID NO: 82 (10)	ND	35,32	<3	0,034
SEQ ID NO: 82 (11)	ND	38,07	3,42	0,046
SEQ ID NO: 82 (12)	ND	34,72	<3	0,027
SEQ ID NO: 82 (13)	ND	48,79	3,06	0,034
SEQ ID NO: 82 (15)	>1000	<30	8,35	0,043
SEQ ID NO: 82 (16)	>1000	34,35	<3	0,026
SEQ ID NO: 82 (17)	>1000	<30	<3	0,025
SEQ ID NO: 82 (18)	>1000	38,70	<3	0,028
SEQ ID NO: 82 (20)	>1000	<30	>30	0,031
SEQ ID NO: 82 (21)	>1000	<30	>30	0,085
SEQ ID NO: 82 (22)	>1000	<30	>30	0,083
SEQ ID NO: 82 (23)	>1000	<30	>30	0,084
SEQ ID NO: 82 (24)	>1000	<30	>30	0,084
SEQ ID NO: 82 (25)	>1000	2,15	40,40	0,085
SEQ ID NO: 82 (26)	>1000	<30	>30	0,087
SEQ ID NO: 156	>1000	<30	<3	0,085
SEQ ID NO: 158	>1000	<30	<3	<0,03
SEQ ID NO: 82 (55)	>1000	0,97	14,34	0,039
SEQ ID NO: 82 (1)	ND	>10	<100	<0,1
SEQ ID NO: 87 (1)	ND	>10	<100	<0,1
SEQ ID NO: 87 (4)	ND	>10	>300	<0,1

Actividad inhibidora del aptámero de NGF frente a otras neurotrofinas

	BDNF (Cl ₅₀)	NT3 (Cl ₅₀)	NT4 (Cl ₅₀)	NGF (Cl ₅₀)
SEQ ID NO: 88 (1)	ND	>10	<100	<0,1
SEQ ID NO: 88 (4)	ND	>10	300	<0,1
SEQ ID NO: 89 (4)	ND	>10	271	<0,1

ND significa no medido.

Ejemplo 17: acción analgésica del aptámero de NGF

Para estudiar la acción analgésica del aptámero de NGF sobre el dolor inducido por NGF, se usó un modelo de hiperalgesia térmica inducida por administración subcutánea de NGF a la pata trasera de la rata. Para el experimento, se usaron ratas Jcl:SD (de 6 semanas de edad). Como índice de hiperalgesia térmica, se utilizó la latencia de la respuesta del comportamiento de escape a la irradiación infrarroja desde un aparato de medición de estimulación del calor plantar (fabricado por Ugo Basile) hasta la planta. El día anterior de la prueba, se realizó la aclimatación al sistema de evaluación. Antes de la administración en el día de la prueba, se midió la latencia de la respuesta de escape, y se usaron animales que mostraron no menos de 10 segundos y menos de 20 segundos. Se mezclaron β-NGF humano (R&D Systems, concentración final 50 µg/ml) y una sustancia de prueba con vehículo (20 mM Tris-HCl (pH 7,6), 145 mM NaCl, 5,4 mM KCl, 0,8 mM MgCl₂, 1,8 mM CaCl₂, 0,1% de BSA), se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos y se administró por vía subcutánea a la planta del pie izquierdo a 10 µl. La latencia de la respuesta de escape se midió 5 horas después. El aptámero representado por la SEQ ID NO: 153 se administró a una concentración final de 50 mg/ml (relación molar relativa a NGF: 1000 veces). Como control, se administró el vehículo o una mezcla de vehículo y NGF de la misma manera. Los resultados se muestran en la Tabla 3 (Media±EEM, n = 9).

A las 5 horas después de la administración, el grupo de NGF mostró una latencia de respuesta de escape significativamente baja en comparación con el grupo vehículo (p <0,01). A las 5 horas después de la administración, la latencia de respuesta de escape del grupo de administración del aptámero fue alta (p <0,01) en comparación con el grupo de administración de NGF solo. A partir de los resultados anteriores, se encontró que este aptámero puede usarse como un fármaco para el dolor inducido por NGF.

Tabla 3

grupo tratado	latencia de respuesta de escape (seg.)	
	antes del tratamiento	5 horas después
vehículo	14,58±1,14	11,68±0,76
NGF	14,43±1,07	7,37±0,85
aptámero de NGF-50 mg/ml mostrado por SEQ ID No: 153	14,42±0,48	10,57±0,57

Ejemplo 18: Acción analgésica del aptámero de NGF en el modelo de dolor postoperatorio

Para estudiar la eficacia de la terapia con un aptámero de NGF, se usó un modelo de dolor posoperatorio que debía haber inducido hiperalgesia térmica. Para el experimento, se usaron ratas Cr1:CD (SD) (de 5 semanas de edad). La punta de un catéter se introdujo en la vena femoral, la otra punta estaba expuesta desde la parte posterior de la rata. Una semana más tarde, se instaló el sistema de infusión Quick Connect (fabricado por Strategic applications incorporated) en la rata, y se evaluó la hiperalgesia térmica una semana después. Como índice de hiperalgesia térmica, se utilizó la latencia de la respuesta del comportamiento de escape a la irradiación infrarroja desde un aparato de medición de estimulación de calor plantar (fabricado por Ugo Basile) hasta la planta. La aclimatación al sistema de evaluación se realizó 3 días antes del comienzo de la prueba. El día de la prueba, se midió la latencia de la respuesta de escape, y se usaron animales que mostraron no menos de 10 segundos y menos de 20 segundos. El aptámero de NGF se disolvió en solución salina y fue administrado por vía intravenosa con una bomba de jeringa (fabricada por TERUMO CORPORATION) de manera sostenida. Como aptámero de NGF, se usaron el aptámero mostrado por SEQ ID NO: 82 (56) (administrado a 21,2 mg/240 ml/kg/96 horas) y el aptámero mostrado por SEQ ID

NO: 82 (55) (administrado a 10,08 mg/240 ml/kg/96 horas). Como control, se administró el vehículo de la misma manera. A 1 hora del inicio de la administración, se incidió la piel y la fascia de la suela trasera derecha, el flexor se bisecó verticalmente y se suturó la piel. La latencia de la respuesta de escape se midió después de la operación de incisión, y 1, 2, 3, 4 días después. Los resultados se muestran en la Tabla 4.

- 5 El grupo de vehículo mostró una latencia de respuesta de escape significativamente baja ($p < 0,01$) a 1, 2, 3, y 4 días después de la operación de incisión-administración en comparación con antes de la operación de incisión-administración. A los 1, 2, 3, y 4 días después de la operación de incisión-administración, la latencia de la respuesta de escape de cualquier grupo de administración de aptámero fue significativamente alta ($p < 0,01$) en comparación con el grupo de vehículo. Los resultados del experimento se muestran en la Tabla 4 y la Tabla 5 (Media \pm EEM, n=8 - 9). Esto ha revelado que un aptámero anti-NGF tiene una acción analgésica en el modelo de dolor postoperatorio.

Tabla 4

	latencia de la respuesta de escape (segundos)	
	vehículo	SEQ ID NO:82 (56)
después de la operación de incisión-administración		
día 0	13,21 \pm 0,51	13,08 \pm 0,65
día 1	4,97 \pm 0,60	8,3 \pm 0,84
día 2	6,46 \pm 0,71	8,34 \pm 0,79
día 3	6,78 \pm 0,52	8,05 \pm 0,97
día 4	7,08 \pm 1,32	12,1 \pm 1,41

Tabla 5

	latencia de la respuesta de escape (segundos)	
	vehículo	SEQ ID NO:82 (55)
después de la operación de incisión-administración		
día 0	13,61 \pm 0,64	12,65 \pm 0,46
día 1	3,91 \pm 0,35	9,57 \pm 1,17
día 2	5,65 \pm 0,48	11,60 \pm 1,34
día 3	7,34 \pm 0,53	13,74 \pm 0,83
día 4	8,24 \pm 1,02	16,67 \pm 0,79

15 **Aplicabilidad industrial**

El aptámero descrito en este documento puede ser útil como un medicamento, agente de diagnóstico o reactivo para enfermedades tales como el algia, enfermedades inflamatorias y similares. El aptámero y el complejo también pueden ser útiles para la purificación y concentración de NGF, así como para la detección y cuantificación de NGF.

- 20 Esta solicitud se basa en una solicitud de patente número 2011-213585 presentada en Japón (fecha de presentación: 28 de septiembre de 2011).

Listado de secuencias

<110> RIBOMIC Inc.

<120> Aptámero para NGF y sus aplicaciones

<130> X1603 EP S3
 <140> EP 12 83 5044.4
 <141> 2012-09-28
 <150> JP2011-213585
 5 <151> 2011-09-28
 <160> 168
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 83
 10 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Aptámero para NGF
 <400> 1
 gggagaacuu cgaccagaag uugacgacca acucgucucu uauggauuuu cgugaaccgg 60
 15 uaugugcgca uacauggauc cuc 83
 <210> 2
 <211> 82
 <212> ADN
 <213> Artificial
 20 <220>
 <223> Aptámero para NGF
 <400> 2
 gggagaacuu cgaccagaag uccaaacggg acuuuauacc ucugagucgc cuacgcuccu 60
 augugcgcau acauggauc uc 82
 <210> 3
 25 <211> 83
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Aptámero para NGF
 30 <400> 3
 gggagaacuu cgaccagaag uuggcacauc cugcugcgua guuuccgucu ccguggcugu 60
 uaugugcgca uacauggauc cuc 83
 <210> 4
 <211> 91
 <212> ADN
 35 <213> Artificial
 <220>
 <223> Aptámero para NGF
 <400> 4
 gggagaacuu cgaccagaag uacguuagua cguuugcaua uguacaaccu ugcauacgau 60
 acguagauua ugugcgcaua cauggaucu c 91
 40 <210> 5
 <211> 83
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>

ES 2 687 154 T3

	<223> Aptámero para NGF	
	<400> 5	
	gggagaacuu cgaccagaag uuagaagagg acuaguugcu aaugcccugg uucgucgcu	60
	uaugugcgca uacauggauc cuc	83
5	<210> 6 <211> 83 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> Aptámero para NGF	
10	<400> 6	
	gggagaacuu cgaccagaag ugcaauacuu ucgcggaaua ugugcaaacc uugccacgac	60
	uaugugcgca uacauggauc cuc	83
15	<210> 7 <211> 81 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> Aptámero para NGF	
	<400> 7	
	gggagaacuu cgaccagaag acgcaccucu uaucacacau gcgucagccu ugugauacua	60
	ugugcgcaua cauggaucu c	81
20	<210> 8 <211> 83 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> Aptámero para NGF	
25	<400> 8	
	gggagaacuu cgaccagaag auccacuggu acuacgugac cccgcgauagg caauccugcu	60
	uaugugcgca uacauggauc cuc	83
30	<210> 9 <211> 73 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> Aptámero para NGF	
35	<400> 9	
	gggagaacuu cgaccagaag uggcacauc cugcugcgua guuuccgucu ccguggcugu	60
	uaugugcgca uac	73
40	<210> 10 <211> 68 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> Aptámero para NGF	
	<400> 10	

gggagaacuu cgaccagaag uggcacauc cugcugcgua guuuccgucu ccguggcugu 60
 uaugugcg 68
 <210> 11
 <211> 46
 <212> ADN
 5 <213> Artificial
 <220>
 <223> Aptámero para NGF
 <400> 11
 gggcacauc ugcugcguag uuuccgucuc cguggcuguu augugc 46
 10 <210> 12
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 15 <223> Aptámero para NGF
 <400> 12
 ggguccugcu gcuaguuuu cgucuccgug gcuguuacc 40
 <210> 13
 <211> 42
 20 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Aptámero para NGF
 <400> 13
 25 gggguccugc ugcuaguuu ccgucuccgu ggcuguuacc cc 42
 <210> 14
 <211> 78
 <212> ADN
 <213> Artificial
 30 <220>
 <223> Aptámero para NGF
 <400> 14
 gggagaacuu cgaccagaag ugcaauacuu ucgcggcaua ugugcaaacc uugccacgac 60
 uaugugcgca uacaugga 78
 <210> 15
 35 <211> 73
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Aptámero para NGF
 40 <400> 15
 gggagaacuu cgaccagaag ugcaauacuu ucgcggcaua ugugcaaacc uugccacgac 60
 uaugugcgca uac 73
 <210> 16
 <211> 63
 <212> ADN
 45 <213> Artificial
 <220>

ES 2 687 154 T3

<223> Aptámero para NGF

<400> 16
 cgaccagaag ugcaauacuu ucgcggaaua ugugcaaacc uugccacgac uaugugcgca 60
 uac 63

5 <210> 17
 <211> 58
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Aptámero para NGF

10 <400> 17
 agaagugcaa uacuucgcg gcauauugc aaaccuugcc acgacuaugu gcgcauac 58

<210> 18
 <211> 48
 <212> ADN
 15 <213> Artificial

<220>
 <223> Aptámero para NGF

<400> 18
 ugcauacuu ucgcggaaua ugugcaaacc uugccacgac uaugugcg 48

20 <210> 19
 <211> 46
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 25 <223> Aptámero para NGF

<400> 19
 gcauacuuu cgcggcauu gugcaaaccu ugccacgacu augugc 46

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

<220>
 <223> Aptámero para NGF

<400> 20
 35 gugcauacu uucgcggaau augugcaaac cuugccacga cuaugugcg 50

<210> 21
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> Artificial

40 <220>
 <223> Aptámero para NGF

<400> 21
 gggauacuu ucgcggaaua ugugcaaacc uugccacgac uauguccc 48

<210> 22
 45 <211> 83
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Aptámero para NGF

ES 2 687 154 T3

	<400> 22		
	gggagaacuu cgaccagaag uggcacauc cugcugcgua guuuccgucu ucguggcugu	60	
	uaugugcgca uacauggauc cuc	83	
	<210> 23		
	<211> 82		
5	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Aptámero para NGF		
	<400> 23		
	gggagaacuu cgaccagaag uggcacauc ugcugcgua guuuccgucug cguggcuguu	60	
10	augugcgcau acauggauc uc	82	
	<210> 24		
	<211> 83		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
15	<220>		
	<223> Aptámero para NGF		
	<400> 24		
	gggagaacuu cgaccagaag uggcacauc cugcugcgaa guuuccgucu ccguggcugu	60	
	uaugugcgca uacauggauc cuc	83	
	<210> 25		
20	<211> 83		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Aptámero para NGF		
25	<400> 25		
	gggagaacuu cgaccagaag uggcacauc cugcugcgca guuuccgucu acguggcugu	60	
	uaugugcgca uacauggauc cuc	83	
	<210> 26		
	<211> 82		
	<212> ADN		
30	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Aptámero para NGF		
	<400> 26		
	gggagaacuu cgaccagaag uggcacauc ugcugcgua guuuccgucu cguggcuguu	60	
	augugcgcau acauggauc uc	82	
35	<210> 27		
	<211> 83		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
40	<223> Aptámero para NGF		
	<400> 27		
	gggagaacuu cgaccagaag uggcacauc cugcugcgca guuuccgucu gcguggcugu	60	
	uaugugcgca uacauggauc cuc	83	

ES 2 687 154 T3

	<210> 28	
	<211> 83	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
5	<220>	
	<223> Aptámero para NGF	
	<400> 28	
	gggagaacuu cgaccagaag uuggcacauc cugcugcgua guuuccaucu gcguggcugu	60
	uaugugcgca uacauggauc cuc	83
10	<210> 29	
	<211> 81	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Aptámero para NGF	
15	<400> 29	
	gggagaacuu cgaccagaag uucacaucuu gcugcggaagu uuccuucuc guggcuguua	60
	ugugcgcaua cauggauc c	81
20	<210> 30	
	<211> 85	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Aptámero para NGF	
	<400> 30	
	gggagaacuu cgaccagaag uuggcacauc cugcugcgaa gguuccgucu ucguggcugu	60
	acuaugugcg cauacaugga uccuc	85
25	<210> 31	
	<211> 83	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
30	<223> Aptámero para NGF	
	<400> 31	
	gggagaacuu cgaccagaag uuggcacauc cugcugcgca guuucccucu gcguggcugu	60
	uaugugcgca uacauggauc cuc	83
35	<210> 32	
	<211> 83	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Aptámero para NGF	
	<400> 32	
	gggagaacuu cgaccagaag uuggcacauc cugcugcgga guuuccuucu ucguggcugu	60
40	uaugugcgca uacauggauc cuc	83
	<210> 33	
	<211> 83	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	

ES 2 687 154 T3

	<220>		
	<223> Aptámero para NGF		
	<400> 33		
	gggagaacuu cgaccagaag uggcacauc cugccgcgua guuuccuuc ugguggcgug	60	
	uaugugcgca uacauggauc cuc	83	
5	<210> 34		
	<211> 83		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
10	<223> Aptámero para NGF		
	<400> 34		
	gggagaacuu cgaccagaag uggcacauc cugccgcgua guuuccgucu gcguggcugu	60	
	uaugugcgca uacauggauc cuc	83	
	<210> 35		
	<211> 83		
15	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Aptámero para NGF		
	<400> 35		
	gggagaacuu cgaccagaag uggcacauc cuguugcgua guuuccuuc acguggcugu	60	
20	uaugugcgca uacauggauc cuc	83	
	<210> 36		
	<211> 92		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
25	<220>		
	<223> Aptámero para NGF		
	<400> 36		
	gggagaacuu cgaccagaag guacguuagu acguuugcau auguacaacc uugcauacga	60	
	uacguagguu augugcgcau acauggauc uc	92	
	<210> 37		
30	<211> 83		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Aptámero para NGF		
35	<400> 37		
	gggagaacuu cgaccagaag uggcacauc cugcuacgua guuuccuuc ucguggcugu	60	
	uaugugcgca uacauggauc cuc	83	
	<210> 38		
	<211> 40		
40	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Aptámero para NGF		
	<400> 38		
	ggguccugcu gcguaguuc cgucucgcg gcuguuaccc	40	
		67	

<210> 39
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Artificial

5 <220>
 <223> Aptámero para NGF

<400> 39
 ggguccugcu gcgaguuuc cgucugcgug gcuguuaccc 40

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

<220>
 <223> Aptámero para NGF

15 <400> 40
 ggguccugcu gcguaguuc caucugcgug gcuguuaccc 40

<210> 41
 <211> 40
 <212> ADN

20 <213> Artificial

<220>
 <223> Aptámero para NGF

<400> 41
 ggguccugcu gcgaaguuc cuucuucgug gcuguuaccc 40

25 <210> 42
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>

30 <223> Aptámero para NGF

<400> 42
 ggguccugcu gcgaguuuc ccucugcgug gcuguuaccc 40

<210> 43
 <211> 40
 <212> ADN

35 <213> Artificial

<220>
 <223> Aptámero para NGF

<400> 43
 ggguccugcu gcggaguuc cuucuucgug gcuguuaccc 40

<210> 44
 <211> 40
 <212> ADN

45 <213> Artificial

<220>
 <223> Aptámero para NGF

<400> 44
 ggguccugcc gcguaguuc cgucugcgug gcuguuaccc 40

<210> 45
 <211> 40
 <212> ADN

50

<213> Artificial

<220>

<223> Aptámero para NGF

<400> 45

5 ggguccuguu gcgaguuuu cuucuacgug gcuguuaccc 40

<210> 46

<211> 40

<212> ADN

<213> Artificial

10 <220>

<223> Aptámero para NGF

<400> 46

ggguccugcu ggcaguuuc cgucuacgug gcuguuaccc 40

<210> 47

<211> 40

<212> ADN

<213> Artificial

15 <220>

<223> Aptámero para NGF

<400> 47

20 ggguccugcu gcgaguuuuc cgucuucgug gcuguuaccc 40

<210> 48

<211> 83

<212> ADN

25 <213> Artificial

<220>

<223> Aptámero para NGF

<400> 48

gggagaacuu cgaccagaag uggcacauc cugcugcgga guuuccgucu cgguggcugu 60

uaugugcgca uacauggauc cuc 83

30 <210> 49

<211> 83

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

35 <223> Aptámero para NGF

<400> 49

gggagaacuu cgaccagaag uuugcacauc cugcugcgua guuuccgucu acguggcugu 60

uaugugcgca uacauggauc cuc 83

<210> 50

<211> 83

<212> ADN

40 <213> Artificial

<220>

<223> Aptámero para NGF

<400> 50

gggagaacuu cgaccagaag cuggcacauc cuguugcgua guuuccgucu acgugacugu 60

45 uaugugcgca uacauggauc cuc 83

<210> 51

ES 2 687 154 T3

	<211> 83	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
5	<223> Aptámero para NGF	
	<400> 51	
	gggagaacuu cgaccagaag uggcacacc cugcuacgga guuuccgucu cgguggcugu	60
	uaugugcgca uacauggauc cuc	83
10	<210> 52	
	<211> 83	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
15	<223> Aptámero para NGF	
	<400> 52	
	gggagaacuu cgaccagaag uggcacauc cugcugcaua guuuccgucu uuguggcugu	60
	uaugugcgca uacauggauc cuc	83
	<210> 53	
	<211> 83	
20	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Aptámero para NGF	
	<400> 53	
	gggagaacuu cgaccagaag uuugcacauc cugcugcgca guuuccgucu acguggcugu	60
25	uaugugcgca uacauggauc cuc	83
	<210> 54	
	<211> 83	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
30	<220>	
	<223> Aptámero para NGF	
	<400> 54	
	gggagaacuu cgaccagaag uggcacauc cugaugcgua guuuccgucu gcgugucugu	60
	uaugugcgca uacauggauc cuc	83
	<210> 55	
35	<211> 83	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Aptámero para NGF	
40	<400> 55	
	gggagaacuu cgaccagaag uggcacauc cuguugcgua guuuccgucu gcguggcugu	60
	uaugugcgca uacauggauc cuc	83
	<210> 56	
	<211> 82	
	<212> ADN	
45	<213> Artificial	

ES 2 687 154 T3

	<220>		
	<223> Aptámero para NGF		
	<400> 56	gggagaacuu cgaccagaag uugcacauc ugcuguguag uuuccgucug caugguuguu	60
		augugcgcau acauggauc uc	82
5	<210> 57		
	<211> 83		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
10	<223> Aptámero para NGF		
	<400> 57	gggagaacuu cgaccagaag uaggcacguc cugcugcaua guuuccgucu guguggcugu	60
		uaugugcgca uacauggauc cuc	83
	<210> 58		
	<211> 83		
15	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Aptámero para NGF		
	<400> 58	gggagaacuu cgaccagaag uugacacauc cugcugcgua guuuccgucu gcgugguugu	60
20		uaugugcgca uacauggauc cuc	83
	<210> 59		
	<211> 83		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
25	<220>		
	<223> Aptámero para NGF		
	<400> 59	gggagaacuu cgaccagaag uuugcacauc cugcugcgua guuuccuucu gcgugguugu	60
		uaugugcgca uacauggauc cuc	83
	<210> 60		
30	<211> 83		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Aptámero para NGF		
35	<400> 60	gggagaacuu cgaccagaag uuggcacauc cugcugcaga guuuccgucu cgguggcugu	60
		uaugugcgca uacauggauc cuc	83
	<210> 61		
40	<211> 83		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Aptámero para NGF		
45	<400> 61		

ES 2 687 154 T3

	gggagaacuu cgaccagaag uuagcacauc cugcugcgua guuuccgucu ucgcgguugu	60
	uaugugcgca uacauggauc cuc	83
	<210> 62	
	<211> 40	
	<212> ADN	
5	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Aptámero para NGF	
	<400> 62	
	ggguccugcu gcgaguuuc cgucucggug gcuguuacc	40
10	<210> 63	
	<211> 40	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
15	<223> Aptámero para NGF	
	<400> 63	
	ggguccugcu gcuaguuuc cgucuacgug gcuguuacc	40
	<210> 64	
	<211> 40	
20	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Aptámero para NGF	
	<400> 64	
25	ggguccuguu gcuaguuuc cgucuacgug acuguuacc	40
	<210> 65	
	<211> 40	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
30	<220>	
	<223> Aptámero para NGF	
	<400> 65	
	ggguccugcu acgaguuuc cgucucggug gcuguuacc	40
	<210> 66	
35	<211> 40	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Aptámero para NGF	
40	<400> 66	
	ggguccugcu gcuauguuc cgucuuugug gcuguuacc	40
	<210> 67	
	<211> 40	
	<212> ADN	
45	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Aptámero para NGF	
	<400> 67	
	ggguccugcu ggcaguuuc cgucuacgug gcuguuacc	40
		72

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

5 <220>
 <223> Aptámero para NGF

<400> 68
 ggguccugau gcgaguuuuc cgucugcgug ucuguuaccc 40

10 <210> 69
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Aptámero para NGF

15 <400> 69
 ggguccuguu gcgaguuuuc cgucugcgug gcuguuaccc 40

<210> 70
 <211> 40
 <212> ADN

20 <213> Artificial

<220>
 <223> Aptámero para NGF

<400> 70
 ggguccugcu guguaguuuuc cgucugcaug guuguuaccc 40

25 <210> 71
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>

30 <223> Aptámero para NGF

<400> 71
 ggguccugcu gcaguuuuc cgucugugug gcuguuaccc 40

<210> 72
 <211> 40

35 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Aptámero para NGF

<400> 72
 ggguccugcu gcgaguuuuc cgucugcgug guuguuaccc 40

<210> 73
 <211> 40
 <212> ADN

45 <213> Artificial

<220>
 <223> Aptámero para NGF

<400> 73
 ggguccugcu gcgaguuuuc cuucugcgug guuguuaccc 40

<210> 74

50 <211> 40
 <212> ADN

<213> Artificial
 <220>
 <223> Aptámero para NGF
 <400> 74
 5 ggguccugcu gcagaguuuc cgucucggug gcuguuaccc 40
 <210> 75
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Artificial
 10 <220>
 <223> Aptámero para NGF
 <400> 75
 ggguccugcu gcuaguuuc cgucucgug guuguuaccc 40
 <210> 76
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Artificial
 15 <220>
 <223> Aptámero para NGF
 <400> 76
 20 ggguccugau uaagaguuuc cgucucguua ucuguuaccc 40
 <210> 77
 <211> 40
 <212> ADN
 25 <213> Artificial
 <220>
 <223> Aptámero para NGF
 <400> 77
 ggguccugac uaagaguuuc cgucucguag ucuguuaccc 40
 30 <210> 78
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 35 <223> Aptámero para NGF
 <400> 78
 ggguccuggc caagaguuuc cgucucgugg ucuguuaccc 40
 <210> 79
 <211> 40
 40 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Aptámero para NGF
 <400> 79
 45 ggguccuggu uaagaguuuc cgucucguua ccuguuaccc 40
 <210> 80
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Artificial
 50 <220>

<223> Aptámero para NGF

<400> 80
 ggguccuggc uaagaguuuc cgucucguag ucuguuaccc 40

5 <210> 81
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Aptámero para NGF

10 <400> 81
 ggguccuggu gauaaguuuc cgucuuauca ccuguuaccc 40

<210> 82
 <211> 40
 <212> ADN
 15 <213> Artificial

<220>
 <223> Aptámero para NGF

<400> 82
 ggguccugga uaagaguuuc cgucucguau ccuguuaccc 40

20 <210> 83
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 25 <223> Aptámero para NGF

<400> 83
 ggguccugua caagaguuuc cgucucgugu acuguuaccc 40

<210> 84
 <211> 40
 30 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Aptámero para NGF

<400> 84
 35 ggguccuguc gcuaguuuc cgucuuugcg gcuguuaccc 40

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

40 <220>
 <223> Aptámero para NGF

<400> 85
 ggguccugag uaagaguuuc cgucucauac ucuguuaccc 40

<210> 86
 45 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Aptámero para NGF

50 <400> 86

	ggguccugcu gcuaguuuc cuucugcgug guuguuaccc	40
	<210> 87	
	<211> 40	
5	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Aptámero para NGF	
	<400> 87	
	ggguccugcu caagaguuc cgucucgugg gcuguuaccc	40
10	<210> 88	
	<211> 40	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
15	<223> Aptámero para NGF	
	<400> 88	
	ggguccuguu caagaguuc cgucucguga acuguuaccc	40
	<210> 89	
20	<211> 40	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Aptámero para NGF	
	<400> 89	
25	ggguccugug gaagaguuc cgucucgucc acuguuaccc	40
	<210> 90	
	<211> 40	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
30	<220>	
	<223> Aptámero para NGF	
	<400> 90	
	ggguccugcg uaagaguuc cgucucguau gcuguuaccc	40
35	<210> 91	
	<211> 40	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Aptámero para NGF	
40	<400> 91	
	ggguccugcc uaagaguuc cgucucguag gcuguuaccc	40
	<210> 92	
	<211> 39	
45	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Aptámero para NGF	
	<400> 92	
	ggguccugac caagaguuc cgucucgugg ucuguaccc	39
50	<210> 93	

<211> 40
 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 5 <223> Aptámero para NGF

 <400> 93
 ggguccugcc gcuaguuuu cgucuucgcg guuguuaccc 40

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

 <220>
 <223> Aptámero para NGF

 <400> 94
 15 ggguccugcu gcuaguuuu cgucugcgga gcuguuaccc 40

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

 20 <220>
 <223> Aptámero para NGF

 <400> 95
 ggguccugcu gcuaguuuu caucuucgug gcuguuaccc 40

 <210> 96
 25 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Aptámero para NGF

 30 <400> 96
 ggguccugcu gcuaguuuu cgucuaugug gcuguuaccc 40

 <210> 97
 <211> 40
 <212> ADN
 35 <213> Artificial

 <220>
 <223> Aptámero para NGF

 <400> 97
 ggguccugcu acguaguuuu cgucugcgug gcuguuaccc 40

 40 <210> 98
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 45 <223> Aptámero para NGF

 <400> 98
 ggguccugcu acguaguuuu cgucuacgug gcuguuaccc 40

 <210> 99
 <211> 82
 50 <212> ADN
 <213> Artificial

ES 2 687 154 T3

<220>
 <223> Aptámero para NGF

<400> 99
 gggagaacuu cgaccagaag uccaaacggg acuuuauacc ucugagucgc cuuugcuccu 60
 augugcgcau acauggaucc uc 82

5 <210> 100
 <211> 81
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Aptámero para NGF

<400> 100
 gggagaacuu cgaccagaag accaaacgga cuuuauaccu cugagucgcc uaugcuccua 60
 ugugcgcaua cauggauccu c 81

15 <210> 101
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Aptámero para NGF

20 <400> 101
 ggguccugac guauaguuuu cgucuguaug ucuguuaccc 40

<210> 102
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Artificial

25 <220>
 <223> Aptámero para NGF

<400> 102
 ggguccugag caagaguuuu cgucucaugc ucuguuaccc 40

30 <210> 103
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Aptámero para NGF

35 <400> 103
 ggguccugcu gcuaguuuu cgucugcgug guuguuaccc 40

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

40 <220>
 <223> Aptámero para NGF

<400> 104
 ggguccugau gucaaguuuu cgucuugaug ucuguuaccc 40

45 <210> 105
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Aptámero para NGF

 <400> 105
 ggguccuguu gcuaguuuc cgucuuagug acuguuaccc 40

 5 <210> 106
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 10 <223> Aptámero para NGF

 <400> 106
 ggguccugcu gcuaguuuc cgucugcgua gcuguuaccc 40

 <210> 107
 <211> 40
 15 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Aptámero para NGF

 <400> 107
 20 ggguccugcu gcuaguuuc cgucucgug gcuguuaccc 40

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

 25 <220>
 <223> Aptámero para NGF

 <400> 108
 ggguccuguu gcuaguuuc cgucugcgug acuguuaccc 40

 <210> 109
 30 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Aptámero para NGF

 35 <400> 109
 ggguccugcu gcuaguuuc cuucugcgug gcuguuaccc 40

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

 <220>
 <223> Aptámero para NGF

 <400> 110
 ggguccugcc gcuaguuuc cgucugcgug gcuguuaccc 40

 45 <210> 111
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 50 <223> Aptámero para NGF

ES 2 687 154 T3

<400> 111
 ggguccuguc uaagaguuuc cgucucguag acuguuaccc 40

 <210> 112
 <211> 40
 5 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Aptámero para NGF

 <400> 112
 10 ggguccuguu caagaguuuc cgucucgugg acuguuaccc 40

 <210> 113
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Artificial

 15 <220>
 <223> Aptámero para NGF

 <400> 113
 ggguccugcu guguaguuuc cgucugcaug guuguuaccc 40

 20 <210> 114
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Aptámero para NGF

 25 <400> 114
 ggguccugac aaagaguuuc cgucucguug ucuguuaccc 40

 <210> 115
 <211> 40
 <212> ADN
 30 <213> Artificial

 <220>
 <223> Aptámero para NGF

 <400> 115
 ggguccuguc uaagaguuuc cgucucguag acuguuaccc 40

 35 <210> 116
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 40 <223> Aptámero para NGF

 <400> 116
 ggguccuguu caagaguuuc cgucucguga acuguuaccc 40

 <210> 117
 <211> 40
 45 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Aptámero para NGF

 <400> 117
 50 ggguccuguu gaagaguuuc cgucucguca acuguuaccc 40

ES 2 687 154 T3

<210> 118
 <211> 83
 <212> ADN
 <213> Artificial
 5 <220>
 <223> ADN molde
 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (24)..(63)
 10 <223> n e s a , c , g , o t
 <400> 118
 gaggatccat gtatgcgcac atannnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 60
 nnncttctgg tcgaagttct ccc 83
 <210> 119
 <211> 45
 15 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador
 <400> 119
 20 cggaattcta atacgactca ctatagggag aactcgacc agaag 45
 <210> 120
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial
 25 <220>
 <223> cebador
 <400> 120
 gaggatccat gtatgcgcac ata 23
 <210> 121
 30 <211> 44
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Aptámero para NGF
 35 <400> 121
 gggcacaucc ugcgcuagu uccgucucc gugcuguuau gugc 44
 <210> 122
 <211> 44
 <212> ADN
 40 <213> Artificial
 <220>
 <223> Aptámero para NGF
 <400> 122
 gggcacaucc ugcugcgagu uccgucucg uggcuguuau gugc 44
 45 <210> 123
 <211> 44
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 50 <223> Aptámero para NGF

<400> 123
 gggcacaucc ugugcguagu uuccgucucc gugcuguuau gugc 44
 <210> 124
 <211> 44
 5 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Aptámero para NGF
 <400> 124
 10 gggcacaucc ugcugguagu uuccgucucc uggcuguuau gugc 44
 <210> 125
 <211> 44
 <212> ADN
 <213> Artificial
 15 <220>
 <223> Aptámero para NGF
 <400> 125
 gggcacaucc ugcugcuagu uuccgucucg uggcuguuau gugc 44
 <210> 126
 <211> 44
 20 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Aptámero para NGF
 25 <400> 126
 gggcacaucc ugcugcgugu uuccgucuccg uggcuguuau gugc 44
 <210> 127
 <211> 40
 <212> ADN
 30 <213> Artificial
 <220>
 <223> Aptámero para NGF
 <400> 127
 gggguccucu gcuaguuuuc cgucuccgug guguuacccc 40
 35 <210> 128
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 40 <223> Aptámero para NGF
 <400> 128
 gggguccugc ugcguauuuc cguuccgugg cuguuacccc 40
 <210> 129
 <211> 40
 45 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Aptámero para NGF
 <400> 129
 50 ggggccugcu gcuaguuuuc cgucuccgug gcuguuacccc 40

<210> 130
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Artificial

5 <220>
 <223> Aptámero para NGF

<400> 130
 gggcacaucc ugcugcguag uuuccgucucc guggcuguua ugugc 45

10 <210> 131
 <211> 44
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Aptámero para NGF

15 <400> 131
 gggcacaucc ugcugcguag uuugucuccg uggcuguuau gugc 44

<210> 132
 <211> 45
 <212> ADN
 20 <213> Artificial

<220>
 <223> Aptámero para NGF

<400> 132
 gggcacaucc ugcugcguag uuuccucucc guggcuguua ugugc 45

25 <210> 133
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 30 <223> Aptámero para NGF

<400> 133
 ggggucugc ugcguaguuu ccgucuccgug gcuguuacc c 41

<210> 134
 <211> 45
 35 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Aptámero para NGF

<400> 134
 40 gggcacaucc ugcugcguag uuuccgucuc cguggcugua ugugc 45

<210> 135
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> Artificial

45 <220>
 <223> Aptámero para NGF

<400> 135
 ggggucugcu gcguaguuu cgcucuccgug gcuguuacc c 41

50 <210> 136
 <211> 41
 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Aptámero para NGF

<400> 136

5 ggggucgcgcu gcguaguuuu cgucuccgug gcuguuaccc c 41

<210> 137

<211> 40

<212> ADN

<213> Artificial

10 <220>

<223> Aptámero para NGF

<400> 137

ggggucgcu gcguaguuuu cgucuccgug gcuguacccc 40

<210> 138

<211> 40

<212> ADN

<213> Artificial

15 <220>

<223> Aptámero para NGF

<400> 138

ggggucgcu gcguaguuuu cgucuccgug gcuuuacccc 40

<210> 139

<211> 40

<212> ADN

<213> Artificial

20 <220>

<223> Aptámero para NGF

<400> 139

ggggucgcgcu gcguaguuuu cgucuccgug gcuguacccc 40

<210> 140

<211> 40

<212> ADN

<213> Artificial

25 <220>

<223> Aptámero para NGF

<400> 140

ggggucgcgcu gcguaguuuu cgucuccgug gcuuuacccc 40

<210> 141

<211> 40

<212> ADN

<213> Artificial

30 <220>

<223> Aptámero para NGF

<400> 141

ggggucgcgcu gcguaguuuu cgucuccgug gcuguacccc 40

<210> 142

<211> 79

<212> ADN

<213> Artificial

35 <220>

40 <223> Aptámero para NGF

<400> 141

ggggucgcgcu gcguaguuuu cgucuccgug gcuguacccc 40

<210> 142

<211> 79

<212> ADN

<213> Artificial

45 <220>

50 <220>

<223> ADN molde
 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (21)..(60)
 5 <223> n e s a, c, g, o t
 <400> 142
 ccagttggtg gtgacaatgc nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 60
 gcagctccac aggcttccc 79
 <210> 143
 <211> 36
 10 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador
 <400> 143
 15 taatagcact cactataggg aagcctgtgg agctgc 36
 <210> 144
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 20 <220>
 <223> cebador
 <400> 144
 gcattgtcac caacaactgg 20
 25 <210> 145
 <211> 83
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> ADN molde
 30 <400> 145
 gaggatccat gtatgcgcac ataacagcca cggagacgga aactacgcag caggatgtgc 60
 caacttctgg tcgaagttct ccc 83
 <210> 146
 <211> 22
 <212> ADN
 35 <213> Artificial
 <220>
 <223> oligo ADN
 <400> 146
 agacggaac tacgcagcag ga 22
 40 <210> 147
 <211> 83
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 45 <223> ADN molde
 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (28)..(34)

ES 2 687 154 T3

<223> n es a, c, g, o t
 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (44)..(50)
 5 <223> n es a, c, g, o t
 <400> 147
 gaggatccat gtatgcgcac ataacagnnn nnnngacgga aacnnnnnnn caggatgtgc 60
 caacttctgg tcgaagttct ccc 83
 <210> 148
 <211> 83
 10 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> ADN molde
 <220>
 15 <221> característica_misc
 <222> (23)..(26)
 <223> n es a, c, g, o t
 <220>
 <221> característica_misc
 20 <222> (36)..(42)
 <223> n es a, c, g, o t
 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (52)..(54)
 25 <223> n es a, c, g, o t
 <400> 148
 gaggatccat gtatgcgcac atnnnnggat acgagnnnnn nnctcttatac cnnnatgtgc 60
 caacttctgg tcgaagttct ccc 83
 <210> 149
 <211> 45
 30 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador
 <400> 149
 35 taatagcact cactataggg agaactcga ccagaagtg gcaca 45
 <210> 150
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial
 40 <220>
 <223> cebador
 <400> 150
 gaggatccat gtatgcgcac a 21
 <210> 151
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Artificial
 45 <220>
 <223> Aptámero para NGF

ES 2 687 154 T3

<400> 151
 ggguccugcu gcguauguuc cgucugcgug gcuguuaccc 40
 <210> 152
 <211> 40
 5 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Aptámero para NGF
 <400> 152
 10 ggguccugcu gcguauguuc cgucugcgug gcuguuaccc 40
 <210> 153
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Artificial
 15 <220>
 <223> Aptámero para NGF
 <400> 153
 ggguccugcu gcguauguuc cgucugcgug gcuguuaccc 40
 <210> 154
 <211> 40
 20 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Aptámero para NGF
 25 <400> 154
 ggguccugcu gcguauguuc cgucugcgug gcuguuaccc 40
 <210> 155
 <211> 40
 <212> ADN
 30 <213> Artificial
 <220>
 <223> Aptámero para NGF
 <400> 155
 ggguccugcu ggcaguuuc cgucuacgug gcuguuaccc 40
 <210> 156
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Artificial
 35 <220>
 <223> Aptámero para NGF
 <400> 156
 ggguccugga uaagagtuuc cgucucguau ccuguuaccc 40
 <210> 157
 <211> 40
 45 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Aptámero para NGF
 <400> 157
 50 ggguccugga uaagagutuc cgucucguau ccuguuaccc 40

<210> 158
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Artificial

5 <220>
 <223> Aptámero para NGF

<400> 158
 ggguccugga uaagaguuuc cgucucguau cctguuaccc 40

10 <210> 159
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Aptámero para NGF

15 <400> 159
 ggguccugga uaagaguuuc cgucucguau ccugutaccc 40

<210> 160
 <211> 40
 <212> ADN

20 <213> Artificial

<220>
 <223> Aptámero para NGF

<400> 160
 ggguccugga uaagagtuuc cgucucguau ccuguuaccc 40

25 <210> 161
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Aptámero para NGF

30 <400> 161
 ggguccugga uaagaguuuc cgucucguau cctguuaccc 40

<210> 162
 <211> 40
 <212> ADN

35 <213> Artificial

<220>
 <223> Aptámero para NGF

<400> 162
 ggguccugga uaagagtuuc cgucucguau cctguuaccc 40

<210> 163
 <211> 40
 <212> ADN

40 <213> Artificial

<220>
 <223> Aptámero para NGF

<400> 163
 ggguccugga uaagagtuuc cgucucguau cctguuaccc 40

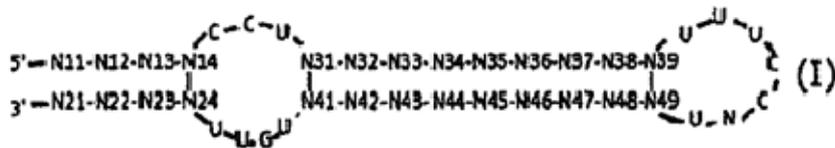
<210> 164
 <211> 40
 <212> ADN

50

<213> Artificial
 <220>
 <223> Aptámero para NGF
 <400> 164
 5 ggguccugga uaagagtuuc cgucucguau cctguuaccc 40
 <210> 165
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Artificial
 10 <220>
 <223> Aptámero para NGF
 <400> 165
 ggguccugga uaagagtuuc cgucucguau cctguuaccc 40
 <210> 166
 15 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Aptámero para NGF
 20 <400> 166
 ggguccugga uaagagtuuc cgucucguau cctguuaccc 40
 <210> 167
 <211> 40
 <212> ADN
 25 <213> Artificial
 <220>
 <223> Aptámero para NGF
 <400> 167
 ggguccugga uaagagtuuc cgucucguau cctguuaccc 40
 30 <210> 168
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 35 <223> Aptámero para NGF
 <400> 168
 ggguccugga uaagagtuuc cgucucguau cctguuaccc 40

REIVINDICACIONES

1. Un aptámero que se une a NGF y es capaz de formar una estructura secundaria potencial representada por la fórmula (I):



5 en donde N es un nucleótido seleccionado del grupo que consiste en A, G, C, U y T,

N11 - N13 y N21 - N23 son iguales o diferentes y cada uno es un enlace o 1 o 2 nucleótidos seleccionados del grupo que consiste en A, G, C, U y T,

N32 - N38 y N42 - N48 son iguales o diferentes y cada uno es 1 o 2 nucleótidos seleccionados del grupo que consiste en A, G, C, U y T,

10 N31, N41, N39 y N49 son iguales o diferentes y cada uno es un nucleótido seleccionado del grupo que consiste en A, G, C, U y T,

N11-N12-N13-N14 y N21-N22-N23-N24 son secuencias de nucleótidos capaces de formar una estructura de tallo en combinación, en donde N14 y N24 forman un par de bases U-a, en donde a es desoxiadenosina

15 N31-N32-N33-N34-N35-N36-N37-N38-N39 y N41-N42-N43-N44-N45-N46-N47-N48-N49 son secuencias de nucleótidos capaces de formar una estructura de tallo en combinación, en donde N31 y N41 y N39 y N49 forman cada uno un par de bases Watson-Crick, y

en donde el aptámero inhibe la actividad de crecimiento de la neurita y/o la actividad de proliferación celular de NGF.

2. El aptámero según la reivindicación 1, en donde N11 - N13, N21 - N23, N32 - N38 y N42 - N48 son iguales o diferentes y cada uno es un nucleótido seleccionado del grupo que consiste en A, G, C, U y T.

20 3. El aptámero según la reivindicación 1 o 2, en donde N14 es U, N24 es a, N31 es G, N41 es C, N39 es G y N49 es C.

4. El aptámero según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde se forman no menos de 4 pares de bases Watson-Crick entre N32-N33-N34-N35-N36-N37-N38 y N42-N43-N44-N45-N46-N47-N48.

25 5. El aptámero según la reivindicación 1, que es un ácido nucleico que consiste en una secuencia de nucleótidos seleccionada de SEQ ID NO: 3, SEQ ID NOs: 9 - 13, SEQ ID NOs: 22 - 29, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NOs: 37 - 98, SEQ ID NOs: 101 - 117 y SEQ ID NOs: 152 - 168 en donde el uracilo puede ser timina.

30 6. Un aptámero que tiene un ácido nucleico que consiste en una secuencia de nucleótidos seleccionada de SEQ ID NO: 3, SEQ ID NOs: 9 - 13, SEQ ID NOs: 22 - 29, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NOs: 37 - 98, SEQ ID NOs: 101 - 117 y SEQ ID NOs: 152 - 168 en donde el uracilo puede ser timina, en donde de 1 a 6 nucleótidos en dichas secuencias de nucleótidos son sustituidos, eliminados, insertados o añadidos y en donde el aptámero se une a NGF e inhibe la actividad de crecimiento de la neurita y/o la actividad de proliferación celular del NGF.

35 7. El aptámero según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que tiene una longitud de base de no más de 50.

8. El aptámero según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde al menos un nucleótido está modificado.

9. El aptámero según la reivindicación 8, que está modificado con dT invertido o polietilenglicol.

40 10. El aptámero según la reivindicación 9, en donde el dT invertido o el polietilenglicol está unido al extremo 5' o al extremo 3' del aptámero.

11. El aptámero según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, en donde los grupos hidroxilo en la posición 2' de una ribosa de los nucleótidos de pirimidina o purina respectivos son iguales o diferentes y no reemplazados o reemplazados con un átomo o grupo seleccionado del grupo que consiste en un átomo de hidrógeno, un átomo de flúor y un grupo metoxi.

45 12. Una composición farmacéutica, un agente contra el dolor o un agente antiinflamatorio que comprende el

aptámero según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11.

13. El aptámero según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, para uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad que acompaña a un dolor o inflamación.

5 14. El aptámero según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, para su uso en la profilaxis o el tratamiento de una enfermedad que acompaña a un dolor o inflamación.

Fig. 2

SEQ ID NO:12

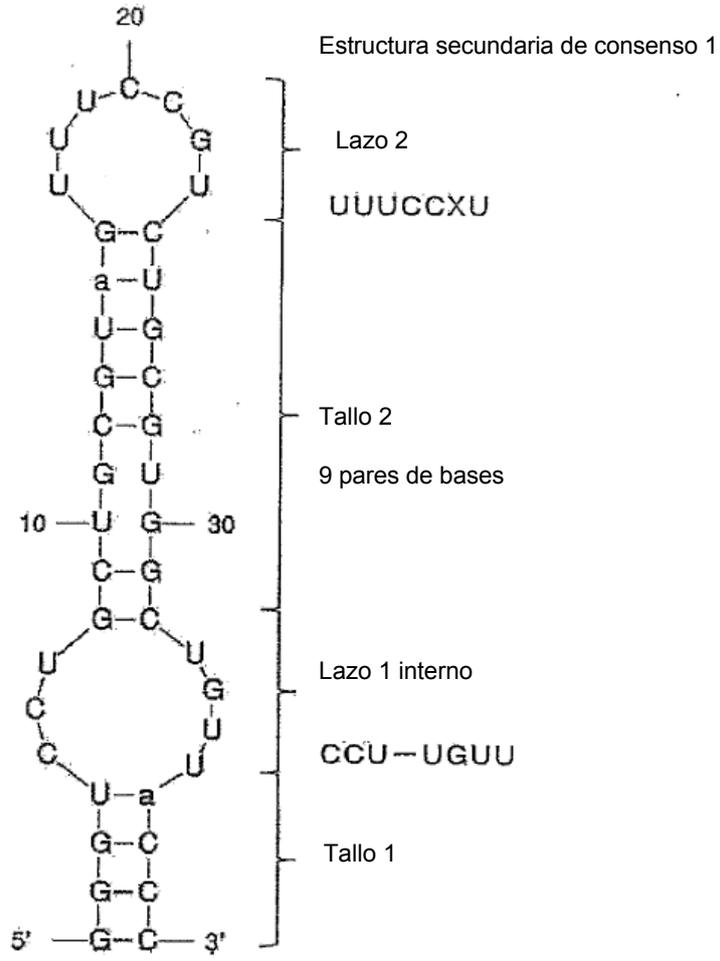


Fig. 3

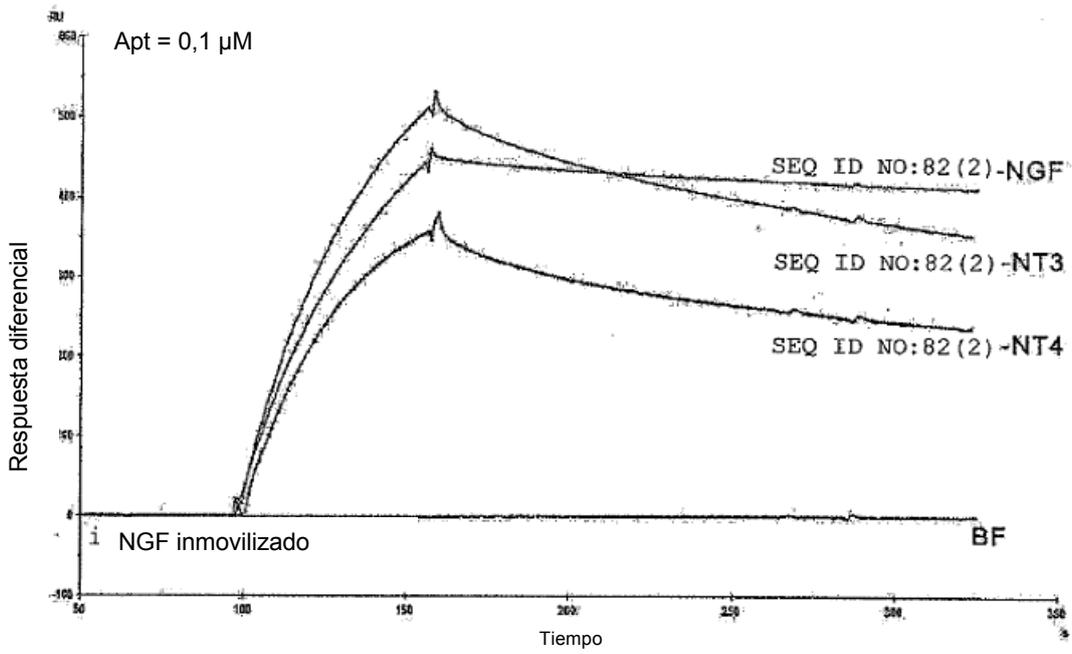


Fig. 4

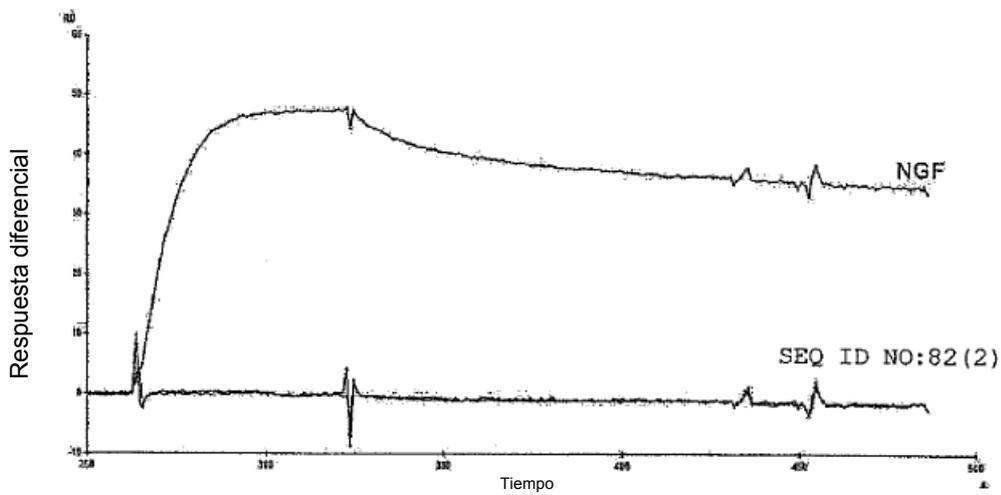


Fig. 5

