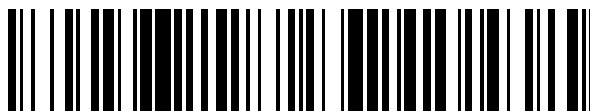


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 768 693**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/115** (2010.01)

**A61K 31/7088** (2006.01)

**A61K 31/712** (2006.01)

**A61P 9/00** (2006.01)

**A61P 19/02** (2006.01)

**A61P 29/00** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

**A61P 37/06** (2006.01)

**A61P 37/08** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.03.2015** **PCT/JP2015/058992**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.10.2015** **WO15147017**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.03.2015** **E 15767725 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.11.2019** **EP 3124611**

54 Título: **Aptámero para FGF2 y uso del mismo**

30 Prioridad:

**24.03.2014 JP 2014060966**

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

**23.06.2020**

73 Titular/es:

**RIBOMIC INC. (100.0%)**  
**16-13, Shirokanedai 3-chome, Minato-ku**  
**Tokyo 108-0071, JP**

72 Inventor/es:

**JIN, LING**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 768 693 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 FGF2 y uso del mismo

### Campo técnico

La presente invención se refiere a un aptámero para FGF2.

### 5 Técnica anterior

El factor de crecimiento básico de fibroblastos (FGF2 o bFGF) es un factor de crecimiento secretado de varias células, el cual está profundamente implicado en la proliferación y diferenciación celular en las etapas de desarrollo, y muestra alta expresión durante la reparación de los tejidos y en los tejidos cancerosos en adultos.

10 Mientras que el FGF2 humano tiene isoformas plurales, sólo una isoforma que tiene el peso molecular más bajo se secreta extracelularmente. Esta isoforma es una proteína de aproximadamente 18 kDa que consiste en 154 aminoácidos, la cual está libre de una cadena de azúcar y tiene un punto isoeléctrico básico de 9.4. Mientras que la función de las isoformas de alto peso molecular (22, 22,5, 24, 34 kD) del FGF2 con marcos de lectura abiertos diferentes no es clara aún, se considera que tiene una función y señal de localización nuclear en el núcleo.

15 Se sabe que la proteína de la familia del FGF humano incluye 22 tipos, del FGF1 al FGF23 (el FGF15 y el FGF19 están ahora unificados como el FGF19, puesto que son las mismas moléculas). Por análisis filogenético, el FGF2 se clasifica en la subfamilia del FGF1 junto con el FGF1. La homología de la secuencia de aminoácidos con el FGF1 es la más alta de todos los FGFs, y su valor es de 55%. El receptor del FGF (FGFR) es una tirosina cinasa receptora y se clasifica en 4 subtipos. Se sabe que cada uno de los FGFR1-3 incluye las isoformas b y c. El FGF2 se une al FGFR1b, FGFR1c, FGFR2c y FGFR3c y FGFR4 del mismo para dimerizar estos receptores.

20 Los fibroblastos del ratón (células NIH-3T3) expresan el FGFR1 en la superficie de la membrana celular. Se sabe que el FGFR1 se activa cuando se une al FGF2 humano. Cuando el FGF2 se une al FGFR1, la ruta de la MAP cinasa (proteína cinasa activada por mitógeno), la ruta de la PIK3 (fosfatidilinositol 3-cinasa)/AKT1 (proteína cinasa B) y similares son activadas por medio del FRS2 (substrato del receptor del factor de crecimiento de fibroblastos 2), el Grb2 (proteína de unión al receptor del factor de crecimiento 2) y SOS y, por último, se induce la expresión de varios genes de citocinas y receptores tales como el VEGF (precursor del factor de crecimiento endotelial vascular)-A, el VEGF-C, HGF (factor de crecimiento de hepatocitos), angiopoietina-2, VEGFR, PDGFR- $\alpha$  (receptor- $\alpha$  del factor de crecimiento derivado de plaquetas beta), y similares.

25 El FGF2 tiene una región de unión a la heparina y, como otros FGFs, se une a la heparina y al sulfato de heparitina. Se considera generalmente que el FGF2 secretado de una célula se une a un sulfato de heparitina de una matriz extracelular, concentrado y protegido de la proteasa. Para funcionar como un Enlazador, el FGF2 necesita ser liberado de la matriz extracelular unida al mismo, en la cual se reporta que la FGF-BP (proteína de unión al FGF) está implicada para facilitar la inducción al FGFR.

30 Se sabe que el FGF2 tiene un fuerte efecto promotor del crecimiento y la migración de las células para las células endoteliales vasculares, y está profundamente implicado en la angiogénesis de tejidos tumorales. Se ha reportado una concentración del FGF2 en suero particularmente alta en los tumores con muchos vasos sanguíneos, por ejemplo, en el cáncer renal y similares, y el FGF2 está presente en varios otros tumores tales como el cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de pulmón, y similares.

35 Factores tales como el FGF1, VEGF, FNT- $\alpha$  (factor de necrosis tumoral- $\alpha$ ), PDGF, EGF (factor de crecimiento epidérmico), MMP (metalopeptidasa de matriz), angiogenina y similares, están implicados en la angiogénesis además del FGF2. Estos factores son secretados de tumores, células angioblásticas, células de soporte y similares, y contribuyen a la angiogénesis como factores de crecimiento de tipo autocrino o paracrino. Sin embargo, el FGF2 es diferente de otros factores, puesto que actúa no sólo sobre las células endoteliales vasculares, sino también sobre las células mesenquimáticas que rodean a las células endoteliales, tales como las células del músculo liso, y similares. En otras palabras, se considera que el FGF2 estimula a las células mesenquimáticas para promover la expresión del PDGF, PDGFR, VEGF, HGF y similares, y estos factores realzan el crecimiento directo de las células endoteliales vasculares.

40 En la actualidad, se han hecho muchos intentos por desarrollar un fármaco que inhiba la angiogénesis anormal en un tejido tumoral para bloquear una ruta de suministro de nutrientes hacia un tejido tumoral. Existe un fármaco que se usa realmente en situaciones clínicas, tal como un anticuerpo monoclonal anti-VEGF humanizado (Avastin (marca comercial registrada)) desarrollado por Genentech, el cual se ha confirmado que muestra un efecto sobre el cáncer de colon y el cáncer pulmonar de células no pequeñas. Sin embargo, aún no se ha desarrollado un fuerte fármaco antitumoral fuerte. Muchos de estos fármacos focalizan el VEGF y el PDGF, y se espera que bloqueen las etapas iniciales de la angiogénesis anormal focalizando el FGF2 que funciona más a contracorriente.

45 La angiogénesis anormal está también implicada, además de en enfermedades tumorales, en enfermedades tales como inflamaciones crónicas (por ejemplo, enfermedad periodontal, esclerodermia, glaucoma neovascular, artritis y

similares), psoriasis, degeneración macular relacionada con la edad, y similares.

Por otra parte, se ha hecho un intento por usar la fuerte acción angiogénica del FGF2 para el tratamiento de trastornos vasculares oclusivos y la cicatrización de heridas. De hecho, la preparación del FGF2 humano (FIBLAST (marca comercial registrada) en aerosol) de Kaken Pharmaceutical Co., Ltd., ya ha sido aprobada y vendida como un fármaco para promover la cicatrización de heridas.

Mientras que el FGF2 es conocido por tener un efecto promotor de la osteogénesis, está también atrayendo la atención como un factor de promoción de la resorción ósea, ya que está implicado en la destrucción articular en los pacientes con artritis reumatoide crónica. En la artritis reumatoide crónica caracterizada por artritis autoinmune, el número de osteoclastos aumenta para promover la resorción ósea, que a su vez progresa hacia la destrucción ósea.

El FGF2 estimula a las células mesenquimáticas para promover la expresión de citocinas inflamatorias y factores de crecimiento tales como el PDGF, PDGFR, VEGF, HGF y similares, y promueve la angiogénesis e induce la destrucción ósea. Se ha aclarado que el FGF2 es una molécula clave implicada en la patología significativa en la artritis reumatoide crónica (documento no de patente 1).

La osteoprotegerina (OPG) es un receptor señuelo de un inductor de osteoclastos, RANKL, y se sabe que antagoniza a RANK y suprime la inducción de la diferenciación de los osteoclastos y la función de los mismos (documento no de patente 2). Se sabe también que la OPG producida de las células sinoviales es suprimida por el estímulo del FGF2 (documento no de patente 3). Además, el FGF2 fomenta el acoplamiento de los osteoblastos y las células precursoras de osteoclastos mediante la inducción de alta expresión de RANKL por los osteoblastos, cuyo resultado promueve la diferenciación en osteoclastos y su activación (documento no de patente 4).

Una vez que la función del FGF2 pueda ser controlada, debe esperarse suficientemente su efecto como un fármaco terapéutico para la destrucción articular por medio de la activación de los osteoclastos. De hecho, se sabe que la administración articular directa de un anticuerpo neutralizante anti-FGF2 a ratas AIA modelo mitiga el síntoma. Sin embargo, un efecto supresor sobre el inicio del mismo es pequeño, y en particular, no se ha confirmado un efecto curativo por la administración después del inicio (documento no de patente 5).

En años recientes, las aplicaciones de aptámeros de ARN a medicamentos, reactivos de diagnóstico y reactivos de prueba han estado llamando la atención; algunos aptámeros de ARN ya han estado en la etapa de estudio clínico o en uso práctico. En diciembre de 2004, el primer fármaco de aptámero de ARN del mundo, Macugen, fue aprobado como un fármaco terapéutico para la degeneración macular relacionada con la edad en los Estados Unidos. Un aptámero de ARN se refiere a un ARN que se une específicamente a una sustancia objetivo tal como una proteína, y puede prepararse usando el método SELEX (evolución sistemática de Enlazadores por enriquecimiento exponencial) (véase los documentos de patente 1-3). En el método SELEX, un ARN que se une específicamente a una sustancia objetivo se selecciona de un depósito de material de ARN con aproximadamente  $10^4$  secuencias de nucleótidos diferentes. La estructura de ARN usada tiene una secuencia aleatoria de aproximadamente 40 residuos, que está flanqueada por secuencias de cebador. Se deja que este depósito de material de ARN sea ensamblado con una sustancia objetivo, y sólo el ARN que se ha unido a la sustancia objetivo se colecta usando un filtro y similares. El ARN colectado se amplifica por RT-PCR, y se usa como molde para la siguiente serie. Repitiendo esta operación aproximadamente 10 veces, a veces puede adquirirse un aptámero de ARN que se une específicamente a la sustancia objetivo.

El documento de patente 4 describe un aptámero que se une al FGF2, que se obtiene por el método SELEX mencionado anteriormente. Sin embargo, las secuencias de los aptámeros son diferentes a las de los aptámeros mostrados específicamente en la presente especificación. Además, este documento no sugiere los aptámeros mostrados específicamente en la presente especificación.

El documento de patente 5 describe un aptámero de FGF2 y uso del mismo.

[Lista de documentos]

[Documentos de patente]

Documento de patente 1: WO 91/19813.

Documento de patente 2: WO 94/08050.

Documento de patente 3: WO 95/07364.

Documento de patente 4: WO 2011/099576.

Documento de patente 5: EP 2535410

[Documentos no de patente]

Documento no de patente 1: Manabe *et al.* N. Rheumatology. 1999; 38; 714-720.

Documento no de patente 2: Yasuda H. *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci USA. 1998; 95; 3597-3602.

Documento no de patente 3: Yano K. *et al.* J. Bone Miner Metab. 2001; 19; 365-372.

Documento no de patente 4: Roccisana JL *et al.* J. Biol Chem 279: 10500-10507 (2004).

Documento no de patente 5: Yamashita A. *et al.* J. Immunol. 2002; 168; 450-457.

## 5 Sumario de la invención

Problemas a resolver por la invención

La presente invención está dirigida a proporcionar un aptámero para el FGF2.

Medios para resolver los problemas

Los presentes inventores investigaron diligentemente para resolver el problema descrito anteriormente, y tuvieron éxito en preparar un aptámero de buena calidad para el FGF2, que dio lugar a la realización de la presente invención.

Por consiguiente, la presente invención es la siguiente:

[1] Un aptámero que se une al FGF2, el cual comprende una secuencia de nucleótidos representada por la siguiente fórmula (1) (en donde el uracilo es opcionalmente timina), y el cual está representado por los incisos (a) o (b) siguientes:



N<sup>1</sup> y N<sup>6</sup> son cada uno independientemente cualquiera de 0 a varias bases,

N<sup>2</sup>, N<sup>3</sup>, N<sup>4</sup> y N<sup>5</sup> son independientemente cualquier base,

(a) un aptámero en donde, en los nucleótidos contenidos en el aptámero,

(i) la posición 2' de la ribosa de cada nucleótido de pirimidina es un átomo de flúor,

(ii) la posición 2' de la ribosa de cada nucleótido de purina es un grupo hidroxilo;

(b) el aptámero de (a), en donde:

(i) el átomo de flúor en la posición 2' de la ribosa de cada nucleótido de pirimidina es independientemente no sustituido, o sustituido por un átomo o grupo seleccionado del grupo que consiste en un átomo de hidrógeno, un grupo hidroxilo y un grupo metoxi,

(ii) el grupo hidroxilo en la posición 2' de la ribosa de cada nucleótido de purina es independientemente no sustituido, o sustituido por un átomo o grupo seleccionado del grupo que consiste en un átomo de hidrógeno, un grupo metoxi y un átomo de flúor.

[2] El aptámero de [1], en donde:

N<sup>1</sup> es G, GG, AG, C o espacio intermedio,

N<sup>2</sup> es A o U,

N<sup>3</sup> es G, C o A,

N<sup>4</sup> es G, C o U,

N<sup>5</sup> es G o U, y

N<sup>6</sup> es UUCN<sup>61</sup> o AGUCN<sup>62</sup>, en donde N<sup>61</sup> y N<sup>62</sup> son cada uno independientemente cualquiera de 0 a varias bases.

[3] El aptámero de [1] o [2], que comprende una secuencia de nucleótidos representada por las fórmulas (2) o (3) siguientes:



[4] El aptámero de cualquiera de [1] a [3], que comprende una secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 2 o 7.

[5] El aptámero de cualquiera de [1] a [3], que comprende una secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 1, 3, 4, 5, 6, 8, 10 u 11.

[6] El aptámero de cualquiera de [1] a [5], en donde 1 o varios nucleótidos son sustituidos, eliminados, insertados o añadidos, el cual es:

- 5 (a) un aptámero en donde, en los nucleótidos contenidos en el aptámero,
  - (i) la posición 2' de la ribosa de cada nucleótido de pirimidina es un átomo de flúor,
  - (ii) la posición 2' de la ribosa de cada nucleótido de purina es un grupo hidroxilo;
- (b) el aptámero de (a), en donde:
  - 10 (i) el átomo de flúor en la posición 2' de la ribosa de cada nucleótido de pirimidina es independientemente no sustituido, o sustituido por un átomo o grupo seleccionado del grupo que consiste en un átomo de hidrógeno, un grupo hidroxilo y un grupo metoxi,
  - (ii) el grupo hidroxilo en la posición 2' de la ribosa de cada nucleótido de purina es independientemente no sustituido, o sustituido por un átomo o grupo seleccionado del grupo que consiste en un átomo de hidrógeno, un grupo metoxi y un átomo de flúor.
- 15 [7] El aptámero de cualquiera de [1] a [6], el cual tiene una longitud de nucleótidos de no más de 45.
- [8] El aptámero de cualquiera de [1] a [7], el cual inhibe la unión del FGF2 y un receptor del FGF.
- [9] El aptámero de cualquiera de [1] a [8], en donde por lo menos un nucleótido es modificado.
- [10] Un complejo que comprende el aptámero de cualquiera de [1] a [9] y una sustancia funcional.
- 20 [11] El complejo de [10], en donde la sustancia funcional es una sustancia de afinidad, una sustancia de marcación, una enzima, un vehículo de suministro de fármacos o un fármaco.
- [12] Un medicamento que comprende el aptámero de cualquiera de [1] a [9] o el complejo de [10] u [11].
- [13] Un medicamento para el tratamiento o profilaxis de una enfermedad en la cual está implicada la angiogénesis anormal, enfermedad articular ósea o dolor, que comprende el aptámero de cualquiera de [1] a [9] o el complejo de [10] u [11].
- 25 [14] El aptámero de cualquiera de [1] a [9] o el complejo de [10] u [11], para su uso en el tratamiento o profilaxis de una enfermedad en la cual está implicada la angiogénesis anormal, enfermedad articular ósea o dolor.

### Efecto de la invención

El aptámero y el complejo de la presente invención pueden ser útiles como fármacos terapéuticos o profilácticos, reactivos de diagnóstico o reactivos para una enfermedad implicada en la angiogénesis anormal, enfermedad articular ósea o dolor. El aptámero y el complejo de la presente invención también pueden ser útiles para la purificación y concentración del FGF2, la marcación del FGF2, y la detección y cuantificación del FGF2.

### Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es un sensorgrama que muestra que los aptámeros mostrados por los identificadores 1 y 2 del aptámero se unen al FGF2 humano.

La figura 2 es un sensorgrama que muestra que el aptámero mostrado por el identificador 1 del aptámero inhibe la unión del FGF2 humano y 4 receptores.

La figura 3 es un sensorgrama que muestra que el aptámero mostrado por el identificador 3 del aptámero no inhibe la unión al FGF1, NGF, EGF o VEGF humano.

### Descripción de las realizaciones

En una realización, la presente invención proporciona: un aptámero que se une al FGF2, el cual comprende una secuencia de nucleótidos representada por la siguiente fórmula (1) (en donde el uracilo es opcionalmente timina), y el cual está representado por los siguientes (a) o (b):



$N^1$  y  $N^6$  son cada uno independientemente cualquiera de 0 a varias bases,

45  $N^2$ ,  $N^3$ ,  $N^4$  y  $N^5$  son independientemente cualquier base,

(a) un aptámero en donde, en los nucleótidos contenidos en el aptámero,

(i) la posición 2' de la ribosa de cada nucleótido de pirimidina es un átomo de flúor,

(ii) la posición 2' de la ribosa de cada nucleótido de purina es un grupo hidroxilo;

(b) el aptámero de (a), en donde:

5 (i) el átomo de flúor en la posición 2' de la ribosa de cada nucleótido de pirimidina es independientemente no sustituido, o sustituido por un átomo o grupo seleccionado del grupo que consiste en un átomo de hidrógeno, un grupo hidroxilo y un grupo metoxi,

10 (ii) el grupo hidroxilo en la posición 2' de la ribosa de cada nucleótido de purina es independientemente no sustituido, o sustituido por un átomo o grupo seleccionado del grupo que consiste en un átomo de hidrógeno, un grupo metoxi y un átomo de flúor.

15 Un aptámero se refiere a una molécula de ácido nucleico que tiene una actividad de unión para una molécula objetivo particular. El aptámero puede inhibir la actividad de una molécula objetivo particular por la unión a la molécula objetivo particular. El aptámero de la presente invención puede ser un ARN, un ADN, un ácido nucleico modificado, o una mezcla de los mismos. El aptámero de la presente invención puede estar también en una forma lineal o circular.

La presente invención proporciona un aptámero que tiene una actividad de unión al FGF2. En una realización, el aptámero de la presente invención puede unirse al FGF2 para inhibir la actividad del FGF2. Es decir, el aptámero de la presente invención puede tener una actividad inhibidora sobre el FGF2.

20 La actividad inhibidora sobre el FGF2 significa una capacidad inhibidora sobre cualquier actividad que tenga el FGF2. Por ejemplo, el FGF2 actúa sobre una célula que expresa el receptor del FGF para activar la transducción de señales e inducir la producción de varios factores de crecimiento celular y receptores de los mismos. Por lo tanto, la actividad inhibidora sobre el FGF2 puede ser una actividad que inhibe la transducción de señales intracelulares por medio de un receptor del FGF. Puesto que la expresión de varios de dichos factores de crecimiento celular y receptores de los mismos resulta en la promoción de la actividad de proliferación celular y la actividad de migración celular, la actividad inhibidora sobre el FGF2 significa inhibición de esas actividades.

Por lo tanto, cuando el aptámero de la presente invención se une al FGF2 e inhibe la unión del FGF2 y un receptor del FGF, una acción asociada con la activación de la ruta de transducción de señales intracelular por medio de un receptor del FGF, por ejemplo, supresión de la muerte celular, proliferación celular, supresión de la producción de osteoprotegerina (OPG) y similares, puede ser inhibida.

30 El FGF2 es una proteína que es fuertemente expresada en el desarrollo temprano y en la diferenciación, el crecimiento y la regeneración y, por ejemplo, una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos representada por el código de acceso EAX05222 o NP001997. El FGF2 es a veces referido también como bFGF (FGF básico), FGFB o HBGF-2. En la presente invención, el FGF2 se produce en el cuerpo de un animal, o también puede producirse a partir de células cultivadas tales como células de mamífero de ratón y similares, células de insectos, *Escherichia coli* y similares, o además también puede producirse por síntesis química. Cuando se produce de células cultivadas o por síntesis química, una variante puede producirse fácilmente por un método conocido *per se*. La "variante" del FGF2 significa una proteína o péptido que tiene por lo menos una actividad de entre las actividades que el FGF2 tiene intrínsecamente, el cual tiene una secuencia de aminoácidos que resulta de la sustitución, deleción, adición y similares, de uno a varios aminoácidos de la secuencia de aminoácidos conocida del FGF2, o una secuencia de aminoácidos que consiste en una parte de la secuencia de aminoácidos conocida del FGF2. Cuando un aminoácido es sustituido o añadido, dicho aminoácido puede ser un aminoácido natural o un aminoácido no natural. El FGF2 en la presente invención incluye variantes del mismo.

45 El "receptor del FGF2" significa una proteína de la superficie de la célula a la cual el FGF2 se une. Como el receptor del FGF2, se conocen el FGFR1b, FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c y FGFR4. El receptor del FGF2 contemplado en la presente invención puede ser una proteína que contiene una secuencia de aminoácidos natural o una variante de la misma. Aquí, la "variante" del receptor del FGF2 significa una proteína o péptido en donde uno a varios aminoácidos de una secuencia de aminoácidos han sido sustituidos, eliminados, añadidos, y similares, o que tiene una secuencia de aminoácidos que consiste en una parte de la secuencia de aminoácidos conocida del receptor del FGF2, el cual tiene una actividad de unión al FGF2. En una realización, la presente invención proporciona un aptámero que inhibe la unión del FGF2 y un receptor del FGF2.

El aptámero de la presente invención puede exhibir actividad inhibidora contra el FGF2 derivado de cualquier mamífero. Dichos mamíferos incluyen primates (por ejemplo, humano, mono), roedores (por ejemplo, ratón, rata y conejillo de Indias) y animales de compañía, animales domésticos y animales de trabajo (por ejemplo, perro, gato, caballo, bovino, cabra, oveja, cerdo).

55 En una realización, el aptámero de la presente invención puede caracterizarse porque puede inhibir la actividad del

FGF2, pero no puede inhibir la actividad del FGF1. Además, en una realización, el aptámero de la presente invención puede caracterizarse porque puede inhibir la unión del FGF2 y un receptor del FGF2, pero no puede inhibir la unión del FGF1 y un receptor del FGF1. El FGF1 es una proteína de la familia del FGF y es más similar al FGF2.

- 5 En la fórmula (1) mencionada anteriormente, N<sup>1</sup> y N<sup>6</sup> son cada uno independientemente cualquiera de 0 a varias bases, y N<sup>2</sup>, N<sup>3</sup>, N<sup>4</sup> y N<sup>5</sup> son independientemente cualquier base. En la presente especificación, la "base" significa cualquiera de adenina (A), guanina (G), citosina (C), uracilo (U) o timina (T) que constituye un ácido nucleico.

- 10 Mientras que el número de bases de N<sup>1</sup> no es particularmente limitado en tanto un aptámero que contiene una secuencia de nucleótidos representada por la fórmula (1) se une al FGF2, puede ser, por ejemplo, 0 – aproximadamente 10, 0 - 9, 0 - 8, 0 - 7, 0 - 6, 0 - 5, 0 - 4, 0 - 3, 0 - 2 y similares, de preferencia 0 - 2.

Asimismo, mientras que el número de bases de N<sup>6</sup> no es particularmente limitado, puede ser, por ejemplo, 0 – aproximadamente 10, 0 - 9, 0 - 8, 0 - 7, 0 - 6, 0 - 5, 0 - 4, 0 - 3 y similares, de preferencia 0 - 10, 3 - 9 o 5 - 8.

En una realización preferible, en la fórmula (1) mencionada anteriormente,

N<sup>1</sup> es G, GG, AG, C o espacio intermedio,

- 15 N<sup>2</sup> es A o U,  
N<sup>3</sup> es G, C o A,  
N<sup>4</sup> es G, C o U,  
N<sup>5</sup> es G o U, y

- 20 N<sup>6</sup> es UUCN<sup>61</sup> o AGUCN<sup>62</sup>, en donde N<sup>61</sup> y N<sup>62</sup> son cada uno independientemente cualquiera de 0 a varias bases. Aquí, N<sup>1</sup> es un "espacio intermedio", y significa que N<sup>1</sup> está ausente en la fórmula (1), a saber, N<sup>1</sup> es la base 0.

Mientras que el número de bases de N<sup>61</sup> no es particularmente limitado, puede ser, por ejemplo, 0 – aproximadamente 10, 0 - 7, 0 - 6, 0 - 5, 0 - 4 y similares, de preferencia 0 - 5, 1 - 5 o 2 - 4.

Mientras que el número de bases de N<sup>62</sup> no es tampoco particularmente limitado, puede ser, por ejemplo, 0 – aproximadamente 10, 0 - 7, 0 - 5, 0 - 4, 0 - 3 y similares, de preferencia 0 - 5, 0 - 4 o 0 - 3.

- 25 En otra realización preferible, en la fórmula (1) mencionada anteriormente,

N<sup>1</sup> es G, GG, AG o espacio intermedio,

N<sup>2</sup> es A o U,

N<sup>3</sup> es G o A,

N<sup>4</sup> es C o U,

- 30 N<sup>5</sup> es G o U,

N<sup>6</sup> es UUCN<sup>61</sup> o AGUCN<sup>62</sup>, en donde N<sup>61</sup> y N<sup>62</sup> son como se definieron anteriormente.

En una realización preferible, el aptámero de la presente invención puede contener una secuencia de nucleótidos representada por las fórmulas (2) o (3) siguientes:

GGGAAACUAGGGCGUUAACGUGACCAGUGUUUCN<sup>61</sup> (fórmula 2)

- 35 N<sup>1</sup>GGAUACUAGGGCAUUA AUGUUACCAGUGUAGUCN<sup>62</sup> (fórmula 3)

en donde N<sup>1</sup>, N<sup>61</sup> y N<sup>62</sup> son como se definieron anteriormente.

En una realización preferible, el aptámero de la presente invención contiene una secuencia de nucleótidos mostrada por cualquiera de SEQ ID NOs: 1 - 12. Las secuencias de nucleótidos mostradas en SEQ ID NOs: 1 - 12 se dan a continuación (en donde el uracilo es opcionalmente timina) (en lo sucesivo, A, G, C y U muestran que la base del nucleótido es adenina, guanina, citosina o uracilo, respectivamente):

- 40 SEQ ID NO: 1:

GGGAUACUAGGGCAUUA AUGUUACCAGUGUAGUCUCGA,

SEQ ID NO: 2:

GGGAAACUAGGGCGUUAACGUGACCAGUGUUUCUCGA,

SEQ ID NO: 3:

GGGAUACUAGGGCAUUAUGUUACCAGUGUAGUCCC,

SEQ ID NO: 4:

5 GGAUACUAGGGCAUUAUGUUACCAGUGUAGUCC,

SEQ ID NO: 5:

GGGGAUACUAGGGCAUUAUGUUACCAGUGUAGUCCCC,

SEQ ID NO: 6:

AGGGAUACUAGGGCAUUAUGUUACCAGUGUAGUCCC,

10 SEQ ID NO: 7:

GGGAAACUAGGGCGUUAACGUGACCAGUGUUUCCC,

SEQ ID NO: 8:

CGGAUACUAGGGCAUUAUGUUACCAGUGUAGUCCG,

SEQ ID NO: 9:

15 CCGAUACUAGGGCAUUAUGUUACCAGUGUAGUCGG,

SEQ ID NO: 10:

GGGAUACUAGGGCGUUAACGUUACCAGUGUAGUCCC,

SEQ ID NO: 11:

GGGAUACUAGGGCCUUAAGGUUACCAGUGUAGUCCC,

20 SEQ ID NO: 12:

GGGAUACUAGGGCAUUUAUGUUACCAGUGUAGUCCC.

En una realización preferible, el aptámero de la presente invención contiene una secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 1, 3, 4, 5, 6, 8, 10 u 11.

25 En otra realización preferible, el aptámero de la presente invención contiene una secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 2 o 7.

En otra realización preferible, el aptámero de la presente invención contiene una secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 1, 3, 4, 5 o 6.

30 En una realización, el aptámero de la presente invención puede contener, en cualquiera de las secuencias de nucleótidos mencionadas anteriormente, una secuencia de nucleótidos en donde 1 o varios nucleótidos son sustituidos, eliminados, insertados o añadidos, en tanto el aptámero todavía se usa al FGF2, y puede ser:

(a) un aptámero en donde, en los nucleótidos contenidos en el aptámero,

(i) la posición 2' de la ribosa de cada nucleótido de pirimidina es un átomo de flúor,

(ii) la posición 2' de la ribosa de cada nucleótido de purina es un grupo hidroxilo;

(b) el aptámero de (a), en donde:

35 (i) el átomo de flúor en la posición 2' de la ribosa de cada nucleótido de pirimidina es independientemente no sustituido, o sustituido por un átomo o grupo seleccionado del grupo que consiste en un átomo de hidrógeno, un grupo hidroxilo y un grupo metoxi,

40 (ii) el grupo hidroxilo en la posición 2' de la ribosa de cada nucleótido de purina es independientemente no sustituido, o sustituido por un átomo o grupo seleccionado del grupo que consiste en un átomo de hidrógeno, un grupo metoxi y un átomo de flúor. Como se usa en la presente, el número de los nucleótidos mencionados anteriormente sustituidos, eliminados, insertados o añadidos no es particularmente limitado, en tanto el

aptámero se una aún al FGF2 incluso después de la sustitución, delección, inserción o adición. Puede ser, por ejemplo, 1 – aproximadamente 10, de preferencia 1 - 6, más preferiblemente 1 - 5, más preferiblemente 1 - 4, más preferiblemente 1 - 3, muy preferiblemente 1 o 2. Mientras que el sitio del nucleótido que va a ser sustituido, eliminado, insertado o añadido no es particularmente limitado en tanto el aptámero se una aún al FGF2 incluso después de la sustitución, delección, inserción o adición, en los sitios que se especifica son un tipo de nucleótido en las fórmulas (1) (2) y (3) mencionadas anteriormente, los nucleótidos son sustituidos, eliminados, insertados o añadidos en 1 - 3, de preferencia 1 o 2, más preferiblemente, 1 sitio. Por otra parte, cuando tipos plurales de nucleótidos pueden estar presentes en las fórmulas (1), (2) y (3), un número mayor de nucleótidos (por ejemplo, 1 – aproximadamente 10, de preferencia 1 - 6, más preferiblemente 1 - 5, más preferiblemente 1 - 4) pueden ser sustituidos, eliminados, insertados o añadidos.

La longitud del aptámero de la presente invención no es particularmente limitada, y usualmente puede ser aproximadamente 10 a aproximadamente 200 nucleótidos y puede ser, por ejemplo, no menos de aproximadamente 20 nucleótidos (por ejemplo, no menos de 25 nucleótidos, no menos de 30 nucleótidos, no menos de 31 nucleótidos, no menos de 32 nucleótidos, no menos de 33 nucleótidos), de preferencia no menos de 25 nucleótidos, más preferiblemente no menos de 30 nucleótidos, más preferiblemente no menos de 33 nucleótidos. Además, puede ser, por ejemplo, no más de aproximadamente 100 nucleótidos, en general no más de aproximadamente 80 nucleótidos, de preferencia no más de aproximadamente 70 nucleótidos, más preferiblemente no más de aproximadamente 60 nucleótidos, más preferiblemente no más de aproximadamente 50 nucleótidos, más preferiblemente no más de aproximadamente 45 nucleótidos (por ejemplo, no más de 44 nucleótidos, no más de 43 nucleótidos, no más de 42 nucleótidos, no más de 41 nucleótidos, no más de 40 nucleótidos). Cuando el número total de nucleótidos es más pequeño, la síntesis química y la producción en masa serán más fáciles, y existe una ventaja importante en términos de costo. Se piensa también que la modificación química es fácil, la estabilidad en el cuerpo es alta y la toxicidad es baja.

Por lo tanto, la longitud del aptámero de la presente invención puede ser en general de aproximadamente 10 - aproximadamente 200 nucleótidos, de preferencia de 20 - 80 nucleótidos, más preferiblemente de 25 - 60 nucleótidos, más preferiblemente de 25 - 50 nucleótidos, muy preferiblemente de 30 - 45 nucleótidos.

El aptámero de la presente invención puede ser un conjugado seleccionado del grupo que consiste en un conjugado de aptámeros plurales que contienen una secuencia de nucleótidos representada por la fórmula (1) mencionada anteriormente (aptámero (A)), un conjugado de aptámeros plurales que contienen una secuencia de nucleótidos en donde 1 o varios nucleótidos son sustituidos, eliminados, insertados o añadidos en la secuencia de nucleótidos representada por la fórmula (1) mencionada anteriormente (aptámero (B)), y un conjugado de 1 aptámero o aptámeros plurales (A) y 1 aptámero o aptámeros plurales (B). Estos conjugados también pueden unirse al FGF2.

Aquí, la conjugación puede lograrse por unión en tándem. En la conjugación, puede usarse un enlazador. Como el enlazador, pueden mencionarse cadenas de nucleótidos (por ejemplo, 1 a aproximadamente 20 nucleótidos) y cadenas no de nucleótidos (por ejemplo, enlazador de  $-(CH_2)_n-$ , enlazador de  $-(CH_2CH_2O)_n-$ , enlazador de hexaetilenglicol, enlazador de TEG, enlazador que contiene péptidos, enlazador que contiene enlaces de  $-S-S-$ , enlazador que contienen enlaces de  $-CONH-$ , enlazador que contienen enlaces de  $-OPO_3-$ ). La pluralidad como se mencionó en el conjugado descrito anteriormente de una pluralidad del mismo no es particularmente limitada, en tanto sea de dos o más, y la pluralidad puede ser, por ejemplo, 2, 3 o 4.

Cada nucleótido contenido en el aptámero de la presente invención es el mismo o diferente, y puede ser un nucleótido que comprenda un grupo hidroxilo en la posición 2' de la ribosa (por ejemplo, ribosa del nucleótido de pirimidina, ribosa del nucleótido de purina) (es decir, un nucleótido natural) o un nucleótido en donde el grupo hidroxilo es sustituido (modificado) por cualquier átomo o grupo en la posición 2' de la ribosa (a veces se indicará como "nucleótido modificado" en la presente invención).

Como ejemplos de cualquiera de dichos átomos o grupos, puede mencionarse un nucleótido sustituido por un átomo de hidrógeno, un átomo de flúor o un grupo -O-alquilo (por ejemplo, grupo -O-Me), un grupo -O-acilo (por ejemplo, grupo -O-CHO) o un grupo amino (por ejemplo, grupo  $-NH_2$ ). En el aptámero de la presente invención, por lo menos un tipo (por ejemplo, los tipos 1, 2, 3 o 4) de nucleótido puede ser también un nucleótido modificado que comprende un grupo hidroxilo, o cualquier átomo o grupo descrito anteriormente, por ejemplo, por lo 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.

En el aptámero de la presente invención, todos los nucleótidos de pirimidina pueden ser nucleótidos en donde la posición 2' de la ribosa es un átomo de flúor, o puede ser el mismo o diferente y nucleótidos en donde el átomo de flúor es no sustituido, o sustituido por cualquier átomo o grupo mencionado anteriormente, de preferencia un átomo o grupo seleccionado del grupo que consiste en un átomo de hidrógeno, un grupo hidroxilo y un grupo metoxi. En particular, cuando un método de producción que usa el kit de transcripción T7 DuraScribe™ mencionado a continuación (fabricado por Epicentre) se aplica como un método de producción del aptámero de la presente invención, puede obtenerse un aptámero en donde la posición 2' de la ribosa de todos los nucleótidos de pirimidina está fluorada. El aptámero de la presente invención en donde el átomo de flúor es sustituido por otro átomo o grupo mencionado anteriormente puede producirse usando el método mencionado a continuación.

En el aptámero de la presente invención, todos los nucleótidos de purina pueden ser nucleótidos en donde la posición 2' de la ribosa es un átomo de flúor, o pueden ser el mismo o diferente y nucleótidos en donde el grupo hidroxilo es no sustituido, o un nucleótido sustituido por cualquier átomo o grupo mencionado anteriormente, de preferencia 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. El aptámero de la presente invención en donde un grupo hidroxilo es sustituido por otro átomo o grupo mencionado anteriormente puede producirse por el método mencionado a continuación.

En el aptámero de la presente invención, todos los nucleótidos de pirimidina pueden ser nucleótidos en donde el átomo de flúor en la posición 2' de la ribosa es sustituido por cualquiera de los átomos o grupos mencionados anteriormente, por ejemplo, los mismos átomos o grupos seleccionados del grupo que consiste en un átomo de hidrógeno, un grupo hidroxilo y un grupo -O-Me.

En el aptámero de la presente invención, además, todos los nucleótidos de purina pueden ser nucleótidos en donde el grupo hidroxilo en la posición 2' de la ribosa es sustituido por cualquiera de los átomos o grupos mencionados anteriormente, por ejemplo, los mismos átomos o grupos seleccionados del grupo que consiste en un átomo de hidrógeno, un átomo de flúor y un grupo -O-Me.

En una realización preferible, cada nucleótido de pirimidina contenido en el aptámero de la presente invención es un nucleótido que contiene un átomo de flúor en la posición 2' de la ribosa, y cada nucleótido de purina es un nucleótido que tiene un grupo hidroxilo en la posición 2' de la ribosa. En otra realización, el átomo de flúor mencionado anteriormente en la posición 2' de la ribosa de cada nucleótido de pirimidina es independientemente opcionalmente sustituido por un átomo o grupo seleccionado del grupo que consiste en un átomo de hidrógeno, un grupo hidroxilo y un grupo metoxi, y el grupo hidroxilo mencionado anteriormente en la posición 2' de la ribosa de cada nucleótido de purina es opcionalmente independientemente sustituido por un átomo o grupo seleccionado del grupo que consiste en un átomo de hidrógeno, un grupo metoxi y un átomo de flúor.

En esta descripción, se supone que los nucleótidos que constituyen el aptámero son moléculas de ARN (es decir, se supone que los grupos azúcar son ribosa) cuando se describe cómo los grupos azúcar son modificados en los nucleótidos. Sin embargo, esto no significa que el ADN está exento de los nucleótidos que constituyen el aptámero, y una modificación del ARN debe leerse como una modificación del ADN, según sea apropiado. 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.

Cuando el uracilo es sustituido con timina en el aptámero de la presente invención, la actividad de unión del FGF2, la actividad inhibidora de la unión del receptor del FGF2-FGF, la estabilidad, la capacidad de suministro de fármacos y la estabilidad del aptámero en la sangre y similares, pueden ser incrementadas.

En el aptámero de la presente invención, 1 o varios, por ejemplo, 1 - 2, 1 - 3, 1 - 4, 1 - 5 nucleótidos del enlace de diéster de ácido fosfórico en el nucleótido pueden ser modificados o sustituidos por cualquier sustituyente. Por ejemplo, el enlace de diéster de ácido fosfórico puede ser sustituido por un enlace de fosforotioato, un enlace de fosforditioato, un enlace de alquilfosfonato, un enlace de fosforamidato, y similares. Aquí, por ejemplo, la expresión "el nucleótido es sustituido por un enlace de fosforotioato" significa que un grupo ácido fosfórico en un sitio de unión entre nucleótidos adyacentes es sulfurado, es decir, un enlace de fosfodiéster es alterado a un enlace de fosforotioato.

En el aptámero de la presente invención, uno o varios, por ejemplo, 1 - 2, 1 - 3, 1 - 4, 1 - 5 nucleótidos pueden ser sustituidos por un ácido nucleico con puentes (BNA) o un ácido nucleico bloqueado (LNA) para estabilizar el aptámero y mejorar la actividad del mismo. Como se usa en la presente, el "ácido nucleico con puentes" se refiere a uno que tiene una estructura en donde la afinidad de unión a una secuencia complementaria es realizada restringiendo el grado de libertad del ácido nucleico por entrelazamiento intramolecular, y adquiere resistencia a la nucleasa. Ejemplos del mismo incluyen, pero no están limitados a, 2',4'-BNA (ácido nucleico bloqueado (LNA)), ácido nucleico con puentes de 2'-O,4'-C-etileno (ENA), y similares.

El aptámero de la presente invención es un aptámero que se une al FGF2, más preferiblemente un aptámero que puede unirse al FGF2 para inhibir la unión del FGF2 y un receptor del FGF. Si el aptámero de la presente invención inhibe la unión del FGF2 y un receptor del FGF puede evaluarse mediante una prueba que usa, por ejemplo, el método de resonancia de plasmones de superficie del ejemplo 1, y similares.

El aptámero de la presente invención pueden ser uno en donde un residuo de azúcar (por ejemplo, ribosa) de cada nucleótido ha sido modificado para incrementar la actividad de unión del FGF2, la estabilidad, la capacidad de suministro de fármacos, y similares. Como ejemplos de la modificación en un residuo de azúcar, pueden mencionarse el reemplazo 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 la modificación, pueden mencionarse la fluoración, la O-alquilación (por ejemplo, O-metilación, O-etilación), la O-arilación, la S-alquilación (por ejemplo, S-metilación, S-etilación), la S-arilación y la aminación (por ejemplo, -NH<sub>2</sub>). Además, ejemplos de la misma incluyen 4'-ARNs, en donde el oxígeno de la posición 4' es reemplazado con azufre, LNA (ácido nucleico bloqueado) en donde la posición

2' y la posición 4' son entrelazadas por medio de metileno, ácido nucleico de 3'-N-fosforamido en donde el grupo hidroxilo de la posición 3' es reemplazado con un grupo amino, y similares. El aptámero de la presente invención es a veces producido con una modificación dada del átomo de oxígeno en la posición 2' de la ribosa del nucleótido de pirimidina, debido al método de producción del mismo. Cuando se aplica un método de producción que usa el kit de transcripción T7 DuraScribe™ mencionado a continuación (fabricado por Epicentre) como un método de producción del aptámero de la presente invención, se produce un aptámero en donde la posición 2' de la ribosa de preferiblemente todos los nucleótidos de pirimidina es fluorada. Por lo tanto, es posible producir variaciones diferentes de aptámeros que tienen actividad incrementada aún cuando la secuencia de bases es la misma, aplicando dicha alteración en el residuo de azúcar al aptámero obtenido. De lo anterior, el aptámero de la presente invención puede ser de preferencia un aptámero en donde un residuo de azúcar de por lo menos un nucleótido es modificado. Dichas alteraciones en el residuo de azúcar pueden realizarse 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). Para ser específicos, puede producirse un aptámero en donde el grupo hidroxilo en la posición 2' de la ribosa es sustituido por un átomo o grupo seleccionado del grupo que consiste en un átomo de hidrógeno, un grupo hidroxilo y un grupo metoxi usando, como una base, un aptámero en donde el grupo hidroxilo en la posición 2' de la ribosa de todos los nucleótidos de pirimidina es sustituido por un grupo fluoro.

El aptámero de la presente invención puede tener también una base del ácido nucleico (por ejemplo, purina o pirimidina) alterada (por ejemplo, por sustitución química) para incrementar la actividad de unión del FGF2, la estabilidad, la capacidad de suministro de fármacos, y similares. Como ejemplos de dichas alteraciones, pueden mencionarse la alteración de la pirimidina en la posición 5, la alteración de la purina en las posiciones 6 y/u 8, la alteración con una amina extracíclica, la sustitución con 4 tiouridina y la sustitución con 5-bromo o 5-yodo-uracilo. El grupo fosfato contenido en el aptámero de la presente invención puede ser alterado para conferir resistencia a la nucleasa y la hidrólisis. Por ejemplo, el grupo P(O)O puede ser reemplazado con P(O)S (tioato), P(S)S (ditioato), P(O)N(R)R' (amidato), P(O)R, P(O)OR, CO o CH<sub>2</sub> (formacetal) o 3'-amina (-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-) [en donde cada unidad de R o R' es independientemente H o un alquilo sustituido o no sustituido (por ejemplo, metilo, etilo)].

El grupo de enlace es, por ejemplo, -O-, -N- o -S-, y los nucleótidos pueden unirse a un nucleótido adyacente por medio de estos grupos de enlace.

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

Una alteración puede realizarse adicionalmente añadiendo a un extremo un polietilenglicol, aminoácido, péptido, dT invertido, ácido nucleico, nucleósidos, miristoilo, oleilo litocólico, docosanilo, lauroilo, estearoilo, palmitoilo, oleoilo, linoleoilo, otros lípidos, esteroides, colesterol, cafeína, vitaminas, colorantes, sustancias fluorescentes, agentes anti-cáncer, toxinas, enzimas, sustancias radiactivas, biotina, y similares. Para dichas alteraciones véase, por ejemplo, las patentes de los Estados Unidos 5,660,985 y 5,756,703.

Particularmente, cuando la alteración se realiza por la adición terminal de PEG, el peso molecular del PEG no es particularmente limitado, y es de preferencia de 1000 - 100000, más preferiblemente de 30000 - 90000. El PEG puede ser lineal o ramificado en dos o más cadenas (PEG de brazos múltiples).

Dicho PEG no es particularmente limitado, y los expertos en la técnica pueden apropiadamente seleccionar y usar un PEG comercialmente disponible o conocido (véase, por ejemplo, [http://www.peg-drug.com/peg\\_product/branched.html](http://www.peg-drug.com/peg_product/branched.html)). Ejemplos preferibles específicos del PEG que se aplicará al aptámero de la presente invención incluyen PEG de tipo GS de 2 ramas que tiene un peso molecular de 40000 (SUNBRIGHT GL2-400GS fabricado por NOF CORPORATION), PEG de tipo TS de 2 ramas que tiene un peso molecular de 40000 (SUNBRIGHT GL2-400TS fabricado por NOF CORPORATION), PEG de tipo TS de 4 ramas que tiene un peso molecular de 40000 (SUNBRIGHT GL4-400TS fabricado por NOF CORPORATION), PEG de tipo TS que tiene un peso molecular de 80000 (SUNBRIGHT GL2-800TS fabricado por NOF CORPORATION), PEG de tipo TS de 4 ramas que tiene un peso molecular de 80000 (SUNBRIGHT GL4-800TS fabricado por NOF CORPORATION), y similares.

En este caso, en el aptámero de la presente invención, el PEG puede ser añadido directamente al extremo. Es más preferible que se añada un enlazador que tenga un grupo enlazable al PEG y similares al extremo del mismo, y el PEG se añadirá al aptámero de la presente invención por medio del enlazador.

El enlazador para el PEG y el aptámero de la presente invención no es particularmente limitado, y el número de cadenas de carbono, el grupo funcional y similares pueden seleccionarse apropiadamente de acuerdo al sitio de unión, el tipo de PEG, y similares. Ejemplos de dicho enlazador incluyen un enlazador que tiene un grupo amino. Específicamente, cuando se añade al extremo 5', puede mencionarse un enlazador ssH (SAFC) o DMS(O)MT-AMINO-MODIFIER (GLEN RESEARCH), y cuando se añade al extremo 3', puede mencionarse TFA Amino C-6 lcaa CPG (ChemGenes), y similares. Cuando se selecciona este enlazador, por ejemplo, un grupo activo de N-hidroxisuccinimida se añade al PEG, y se hace reaccionar con un grupo amino en el lado del enlazador, por lo cual el aptámero de la presente invención puede ser unido al PEG por medio del enlazador.

Como el PEG y el enlazador, pueden usarse de preferencia productos disponibles comercialmente. Las condiciones de reacción y similares relacionados con la unión del PEG, un enlazador y el aptámero de la presente invención pueden ser determinados adecuadamente por los expertos en la técnica.

El aptámero de la presente invención puede sintetizarse químicamente como se describe en la presente y por un método conocido *per se* en la técnica. Un aptámero se une a la sustancia objetivo en una amplia variedad de modos de unión, tales como enlaces iónicos basados en la carga negativa del grupo fosfato, enlaces hidrofóbicos y enlaces de hidrógeno basados en la ribosa, y enlaces de hidrógeno e interacción de apilamiento basada en las bases de los ácidos nucleicos. En particular, los enlaces iónicos basados en la carga negativa del grupo fosfato, los cuales están presentes en el mismo número que el número de nucleótidos constituyentes son fuertes, y se unen a la lisina y arginina que están presentes en la superficie de la carga positiva de la proteína. Por esta razón, las bases de los ácidos nucleicos no implicadas en la unión directa a la sustancia objetivo pueden ser sustituidas. En particular, debido a que la región de la estructura del tallo tiene pares de bases ya formados y mira hacia el interior de la estructura helicoidal doble, es improbable que las bases de los ácidos nucleicos se unan directamente a la sustancia objetivo. Por lo tanto, incluso cuando un par de bases es sustituido con otro par de bases, la actividad del aptámero con frecuencia no disminuye. En estructuras en donde no se forman pares de bases, tales como las estructuras de bucle, siempre que la base del ácido nucleico no esté implicada en la unión directa a la molécula objetivo, la sustitución de bases es posible. Respecto a las modificaciones de la posición 2' de la ribosa, el grupo funcional en la posición 2' de la ribosa rara vez interactúa directamente con la molécula objetivo, pero en muchos casos, no es de relevancia, y puede ser sustituido por otra molécula modificada. Por lo tanto, un aptámero, a menos que el grupo funcional implicado en la unión directa a la molécula objetivo sea sustituido o eliminado, con frecuencia retiene la actividad del mismo. Es también importante que la estructura tridimensional general no cambie sustancialmente.

Un aptámero puede prepararse usando el método SELEX o una versión mejorada del mismo (véase, 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 series o usando una sustancia competente, un aptámero que exhiba un potencial de unión más fuerte para la sustancia objetivo es concentrado y seleccionado. Por lo tanto, ajustando el número de series de SELEX y/o cambiando la condición competitiva, pueden obtenerse en algunos casos aptámeros con diferentes fuerzas de unión, aptámeros con diferentes modos de unión, y aptámeros con la misma fuerza de unión o modo de unión, pero diferentes secuencias de bases. El método SELEX comprende un procedimiento de amplificación por PCR; si se causa una mutación usando iones manganeso y similares en el procedimiento, es posible realizar el método SELEX con mayor diversidad.

Los aptámeros obtenidos por el método SELEX son ácidos nucleicos que muestran alta afinidad por la sustancia objetivo, pero esto no significa la unión a un sitio activo de la sustancia objetivo. Por lo tanto, los aptámeros obtenidos por el método SELEX no necesariamente actúan sobre la función de la sustancia objetivo. El FGF2 es una proteína básica, y se piensa que es probable que permita que los ácidos nucleicos se unan al mismo no específicamente. Un aptámero que no se une a un sitio activo no influye sobre la actividad de la sustancia objetivo. De hecho, el ARN usado para el control no inhibió la unión del FGF2 y un receptor del FGF2.

Usando el aptámero activo seleccionado de esta manera, puede realizarse un método SELEX optimizado para obtener un aptámero que posea una mayor actividad. En el método SELEX optimizado, el método SELEX se realiza de nuevo después de que se prepara un molde en donde un aptámero con una secuencia determinada es parcialmente aleatorizado o un molde impurificado con aproximadamente 10 a 30% de las secuencias aleatorias.

Un aptámero obtenido por el método SELEX tiene una longitud de aproximadamente 80 nucleótidos, y este es difícil de preparar como un agente farmacéutico como está. Por lo tanto, es preferible repetir los esfuerzos de prueba y error para acortar el aptámero hasta una longitud que permita su fácil síntesis química (por ejemplo, aproximadamente 60 nucleótidos o menos, más preferiblemente aproximadamente 50 nucleótidos o menos, muy preferiblemente 45 nucleótidos o menos, permitiendo la síntesis química).

Dependiendo del diseño del cebador para un aptámero obtenido por el método SELEX, la facilidad de la operación de minimización subsiguiente cambia. A menos que el cebador sea diseñado con éxito, el desarrollo posterior será imposible incluso si se selecciona un aptámero con actividad usando el método SELEX.

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

Cuando se identifica una región importante para la unión del aptámero obtenido con la sustancia objetivo por esfuerzos repetidos de prueba y error como se describió anteriormente, la actividad permanece sin cambios en muchos casos incluso cuando se añade una nueva secuencia en ambos extremos de la secuencia. La longitud de la nueva secuencia no es particularmente limitada.

Como se mencionó en un principio, modificaciones, como secuencias, permiten una amplia gama de alteraciones o de diseño.

Como se indicó anteriormente, los aptámeros permiten una amplia gama de diseño o alteraciones. La presente invención proporciona también un método de producción de aptámeros que permite una amplia gama de diseño o alteración de un aptámero que comprende una secuencia especificada (por ejemplo, una secuencia que corresponde a un resto seleccionado de entre regiones del tallo, regiones de bucle internas, regiones de bucle del pasador y regiones de cadena sencilla: en lo sucesivo, abreviada como secuencia fija, según sea requerido).

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

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

en donde (N)a representa una cadena de nucleótidos que consiste en "a" unidades de N; (N)b representa una cadena de nucleótidos que consiste en "b" unidades de N; cada una de las unidades de N, sea idéntica o diferente, es un nucleótido seleccionado del grupo que consiste en A, G, C U y T (de preferencia, A, G, C y U). Cada uno de "a" y "b", sea idéntico o diferente, puede ser cualquier número y puede ser, por ejemplo, 1 a aproximadamente 100, de preferencia 1 a aproximadamente 50, más preferiblemente 1 a aproximadamente 30, aún más preferiblemente 1 a aproximadamente 20 o 1 a aproximadamente 10], o tipos plurales de moléculas de ácido nucleico (por ejemplo, una colección de moléculas de ácido nucleico diferente en el número de a, b, etc.) y pares de cebadores que corresponden a las secuencias de cebador (i) y (ii), respectivamente.

Preferido como el aptámero de la presente invención es un aptámero de cualquiera de los siguientes (a'), (b') o (c'), el cual se une al FGF2 e inhibe la unión del FGF2 y un receptor del FGF:

(a') un aptámero que contiene una secuencia de nucleótidos mostrada en cualquiera de SEQ ID NOs: 1 – 7 (o SEQ ID NO: 2 o 7 o cualquiera de SEQ ID NOs: 1 y 3 - 6) (en donde el uracilo puede ser timina), en donde, en los nucleótidos contenidos en el aptámero,

(i) la posición 2' de la ribosa de cada nucleótido de pirimidina es un átomo de flúor,

(ii) la posición 2' de la ribosa de cada nucleótido de purina es un grupo hidroxilo;

(b') un aptámero que contiene una secuencia de nucleótidos en donde 1 – 5 (o 1 - 4 o 1 - 3) nucleótidos son sustituidos, eliminados, insertados o añadidos en la secuencia de nucleótidos mostrada en cualquiera de SEQ ID NOs: 1 – 7 (o SEQ ID NO: 2 o 7, o cualquiera de SEQ ID NOs: 1 y 3 - 6) (en donde el uracilo puede ser timina), en donde, en el nucleótido contenido en el aptámero,

(i) la posición 2' de la ribosa de cada nucleótido de pirimidina es un átomo de flúor,

(ii) la posición 2' de la ribosa de cada nucleótido de purina es un grupo hidroxilo; o

(c') el aptámero en donde, en el aptámero de (a') o (b'),

(i) el átomo de flúor en la posición 2' de la ribosa de cada nucleótido de pirimidina es independientemente no sustituido, o sustituido por un átomo o grupo seleccionado del grupo que consiste en un átomo de hidrógeno, un grupo hidroxilo y un grupo metoxi,

(ii) el grupo hidroxilo en la posición 2' de la ribosa de cada nucleótido de purina es independientemente no sustituido, o sustituido por un átomo o grupo seleccionado del grupo que consiste en un átomo de hidrógeno, un grupo metoxi y un átomo de flúor, y

más preferido es, de los aptámeros mencionados anteriormente, un aptámero que tiene una longitud de nucleótidos de 30 - 45 nucleótidos.

La presente invención proporciona también un complejo que comprende el aptámero de la presente invención y una sustancia funcional unida al mismo. La unión entre el aptámero y la sustancia funcional en el complejo de la presente invención puede ser un enlace covalente o un enlace no covalente. El complejo de la presente invención puede ser uno en donde el aptámero de la presente invención y una o más (por ejemplo, 2 o 3) de las sustancias funcionales del mismo tipo o de diferentes tipos están unidos juntos. La sustancia funcional no es particularmente limitada, en tanto recién confiera una cierta función a un aptámero de la presente invención, o sea capaz de cambiar (por ejemplo, mejorar) una cierta característica que un aptámero de la presente invención puede poseer. Como ejemplos de la sustancia funcional, pueden mencionarse proteínas, péptidos, aminoácidos, lípidos, azúcares, nucleótidos, monosacáridos y polinucleótidos. Como ejemplos de la sustancia funcional, pueden mencionarse sustancias de afinidad (por ejemplo, biotina, estreptavidina, polinucleótidos que poseen afinidad por la secuencia complementaria objetivo, anticuerpos, glutatión Sepharose, histidina), sustancias para marcación (por ejemplo, sustancias fluorescentes, sustancias luminiscentes, radioisótopos), enzimas (por ejemplo, peroxidasa de rábano

5 picante, fosfatasa alcalina), vehículos de suministro de fármacos (por ejemplo, liposomas, microesferas, péptidos, polietilenglicoles), fármacos (por ejemplo, los usados en la terapia de misiles tales como caliqueamicina y duocarmicina, análogos de la mostaza de nitrógeno tales como ciclofosfamida, melfalán, ifosfamida o trifosfamida; etileniminas tales como tiotepa; nitrosoureas tales como carmustina; agentes alquilizantes 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 vincapervina tales como vinblastina, vincristina o vinorelbina y sus análogos; derivados de podofilotoxina tales como paclitaxel, docetaxel, etopósido o taxanos; 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, topotecan, irinotecan y bicalutamida) y toxinas (por ejemplo, toxina ricina, liatoxina y Vero toxina). Estas moléculas funcionales son removidas finalmente en algunos casos. Además, las moléculas pueden ser péptidos que pueden ser reconocidos y escindidos por enzimas tales como trombina, metaloproteínasa de matriz (MMP) y Factor X, y pueden ser polinucleótidos que pueden ser escindidos por nucleasas o endonucleasas de restricción.

10 El aptámero o el complejo de la presente invención pueden usarse, por ejemplo, como un medicamento, un reactivo de diagnóstico, un reactivo de prueba o un reactivo. En particular, es útil como un medicamento para el tratamiento o profilaxis de enfermedades implicada en la angiogénesis anormal, tales como degeneración macular relacionada con la edad y similares, enfermedades óseas - articulares tales como osteoporosis, artritis reumatoide, osteoartritis, fracturas óseas y similares, o dolor, o un agente de diagnóstico, un reactivo de prueba o un reactivo.

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; desintegrantes tales como almidón, carboximetilcelulosa, hidroxipropilalmidón, glicol-almidón de sodio, carbonato ácido de sodio, fosfato de calcio y citrato de calcio; lubricantes tales como estearato de magnesio, Aerosil, talco y lauril sulfato de sodio; agentes saborizantes tales como ácido cítrico, mentol, sal de amonio de glicirizina, glicina y polvo de naranja; conservadores tales como benzoato de sodio, sulfito ácido de sodio, metilparabeno y propilparabeno; estabilizadores tales como ácido cítrico, citrato de sodio y ácido acético; agentes de suspensión tales como metilcelulosa, polivinilpirrolidona y estearato de aluminio; agentes de dispersión tales como agentes tensoactivos; 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 Preparaciones adecuadas para administración oral son una solución preparada disolviendo una cantidad efectiva de Enlazador en un diluyente tal como agua, solución salina fisiológica o jugo de naranja; cápsulas, sachets o tabletas que comprenden una cantidad efectiva de Enlazador en forma sólida o granular; una suspensión preparada suspendiendo una cantidad efectiva de principio activo en un dispersante apropiado; una emulsión preparada dispersando y emulsionando una solución de una cantidad efectiva de principio activo en un dispersante apropiado, y similares.

25 El medicamento de la presente invención puede ser recubierto mediante un método conocido *per se* con el propósito de enmascarar el sabor, disolución entérica, liberación sostenida y similares, según sea necesario. Como ejemplos de agentes de recubrimiento usados para el recubrimiento, se usan hidroxipropilmetilcelulosa, etilcelulosa, hidroximetilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, polietilenglicol, Tween 80, Pluronic F68, ftalato-acetato de celulosa, ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa, succinato-acetato de hidroximetilcelulosa, Eudragit (fabricado por Rohm, Alemania, copolímero de ácido acrílico y ácido metacrílico), colorantes (por ejemplo, óxido de hierro rojo, dióxido de titanio, y similares), y similares. El medicamento puede ser una preparación de liberación rápida o preparación de liberación sostenida. Ejemplos de la base de la preparación de liberación sostenida incluyen liposomas, atelocolágena, gelatina, hidroxiapatita, PLGA, y similares.

30 Como preparaciones adecuadas para administración parenteral (por ejemplo, administración intravenosa, administración subcutánea, administración intramuscular, administración tópica, administración intraperitoneal, administración intranasal, administración pulmonar, y similares), están disponibles líquidos inyectables estériles isotónicos acuosos y no acuosos, los cuales pueden comprender un antioxidante, una solución de tampón, un agente bacteriostático, un agente de isotonización, y similares. Pueden mencionarse también suspensiones estériles acuosas y no acuosas, las cuales pueden comprender un agente de suspensión, un solubilizador, un espesante, un estabilizador, un antiséptico, y similares. La preparación puede incluirse en un contenedor tal como una ampolla o un vial en un volumen de dosis unitario o en varias dosis divididas. Un principio activo y un vehículo farmacéuticamente aceptable pueden ser también liofilizados y almacenados en un estado que puede ser disuelto o suspendido en un vehículo estéril apropiado poco antes del uso. Además de las inyecciones de líquido, son también aceptables inhalantes y ungüentos. En el caso de un inhalante, un principio activo en un estado liofilizado es micronizado y administrado por inhalación usando un dispositivo de inhalación apropiado. Un inhalante puede formularse según sea apropiado con un agente tensoactivo, aceite, condimento, ciclodextrina o derivado de los mismos usado convencionalmente y similares, según se requiera.

Aquí, como ejemplos del agente tensoactivo, pueden mencionarse 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 sorbitán (nombre comercial, Span 85), monooleato de sorbitán (nombre comercial, Span 80), monolaurato de sorbitán (nombre comercial, Span 20), aceite de ricino endurecido con polioxietileno (nombre comercial, HCO-60), monolaurato de polioxietileno (20) sorbitán (nombre comercial, Tween 20), monooleato de polioxietileno (20) sorbitán (nombre comercial, Tween 80), lecitina de origen natural (nombre comercial, Epiclón), éter de oleoil polioxietileno (2) (nombre comercial, Brij 92), éter de estearil polioxietileno (2) (nombre comercial, Brij 72), éter de lauril polioxietileno (4) (nombre comercial, Brij 30), éter de oleoil polioxietileno (2) (nombre comercial, Genapol 0-020), copolímero de bloque de oxietileno y oxipropileno (nombre comercial, Synperonic), y similares. Span, Tween, Epiclón, Brij, Genapol y Synperonic, son marcas comerciales.

Como ejemplos del aceite, pueden mencionarse 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 apropiada (petrolato amarillo, petrolato blanco, parafina, plastibase, silicón, ungüento blanco, cera de abejas, manteca de cerdo, aceites vegetales, ungüento hidrofílico, petrolato hidrofílico, lanolina purificada, lanolina hidrolizada, ungüento absorbente de agua, plastibase hidrofílica, ungüento de macrogol, y similares) se mezcla con un principio activo, y se usa como una preparación.

Un inhalante puede producirse según un método convencional. Específicamente, puede producirse un inhalante pulverizando o licuando el aptámero descrito anteriormente y el complejo de la presente invención, mezclándolo en un propelente y/o vehículo de inhalación, y vertiéndolos en un recipiente de inhalación apropiado. Cuando el aptámero descrito anteriormente y el complejo de la presente invención es un polvo, puede usarse un inhalador de polvo de tipo mecánico ordinario; en el caso de un líquido, puede usarse un inhalador tal como un nebulizador. Aquí, como el propelente, puede usarse ampliamente uno conocido convencionalmente; pueden mencionarse compuestos de la serie de clorofluorocarbonos tales como clorofluorocarbono-11, clorofluorocarbono-12, clorofluorocarbono-21, clorofluorocarbono-22, clorofluorocarbono-113, clorofluorocarbono-114, clorofluorocarbono-123, clorofluorocarbono-142c, clorofluorocarbono-134a, clorofluorocarbono-227, clorofluorocarbono-C318 y 1,1,1,2-tetrafluoroetano, hidrocarburos tales como propano, isobutano y n-butano, éteres tales como éter dietílico, gases comprimidos tales como nitrógeno gaseoso y dióxido de carbono gaseoso, y similares.

Cuando el medicamento de la presente invención se usa como un medicamento para la profilaxis o el tratamiento de las enfermedades mencionadas anteriormente, el medicamento de la presente invención puede administrarse directamente a una lesión, o puede administrarse de acuerdo a los otros métodos mencionados anteriormente.

Puesto que el aptámero de la presente invención es un ácido nucleico de cadena sencilla, es posible la desintoxicación por la administración de un nucleótido que contiene una secuencia complementaria, y existe una alta posibilidad de que se obtenga un producto farmacéutico con mayor seguridad que un anticuerpo neutralizante que es difícil de controlar dinámicamente después de la administración. Este es un aspecto extremadamente ventajoso en vista del problema de las infecciones que ocurren posiblemente en el anticuerpo en el tratamiento con fármacos y similares, el cual es causado por un tiempo de retención largo del anticuerpo en el cuerpo. En particular, cuando el medicamento de la presente invención se usa como un medicamento para la profilaxis o el tratamiento de las enfermedades mencionadas anteriormente, es obvio, teniendo en cuenta la severidad de la enfermedad y el riesgo de efectos secundarios, que puede obtenerse un medicamento que tiene mayor seguridad usando un aptámero que permita fácil control de la cinética *in vivo*.

La dosis del medicamento de la presente invención varía, dependiendo del tipo y la actividad del principio activo, la seriedad de la enfermedad, la especie animal que es el sujeto de administración, la tolerabilidad del sujeto a la administración del fármaco, el peso corporal, la edad y similares, y la dosis usual, basada en la cantidad de principio activo por día para un adulto, puede ser aproximadamente 0,0001 a aproximadamente 100 mg/kg, por ejemplo, aproximadamente 0,0001 a aproximadamente 10 mg/kg, de preferencia aproximadamente 0,005 a aproximadamente 1 mg/kg.

Además, el aptámero o complejo de la presente invención puede usarse también como un agente de suministro de fármacos, sonda para la formación de imágenes *in vivo*, sonda para medir la concentración del FGF2 en sangre, sonda para la tinción de tejidos, sonda para la ELISA, Enlazador para el FGF2, separación y purificación.

La presente invención proporciona también un vehículo de fase sólida que tiene el aptámero y el complejo de la presente invención inmovilizados sobre el mismo. Como ejemplos del vehículo de fase sólida, pueden mencionarse un sustrato, una resina, una placa (por ejemplo, placa de pocillos múltiples), 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, pueden mencionarse sustratos de níquel-PTFE (politetrafluoroetileno), sustratos de vidrio, sustratos de apatita, sustratos de silicón, 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'-metilenbisacrilamida, partículas de divinilbenceno entrelazadas con poliestireno, partículas de dextrán entrelazadas con epíclorhidrina, fibras de celulosa, polímeros entrelazados de arildextrán y N,N'-metilenbisacrilamida, polímeros sintéticos monodispersos, polímeros hidrofílicos monodispersos,

Sepharose, Toyopearl y similares, y también se incluyeron resinas preparadas uniendo varios grupos funcionales a estas resinas. El vehículo de fase sólida de la presente invención puede ser útil, por ejemplo, en la purificación, detección y cuantificación del FGF2.

El aptámero y el complejo de la presente invención pueden ser inmovilizados sobre un vehículo 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 de la presente invención, y entonces se inmoviliza el aptámero y el complejo sobre un vehículo de fase sólida por medio de la sustancia de afinidad o el grupo funcional predeterminado. La presente invención proporciona también un método de inmovilización del aptámero o complejo de la presente invención sobre un vehículo de fase sólida, y un vehículo de fase sólida obtenido por el mismo. El grupo funcional predeterminado puede ser un grupo funcional que puede ser sometido a una reacción de acoplamiento; por ejemplo, pueden mencionarse un grupo amino, un grupo tiol, un grupo hidroxilo y un grupo carboxilo. La presente invención proporciona también un aptámero que tiene dicho grupo funcional introducido en el mismo.

La presente invención proporciona también un método de purificación y concentración del FGF2. En particular, el método de purificación de la presente invención hace posible separar el FGF2 de otras proteínas de la familia del FGF. El método de purificación y concentración de la presente invención puede comprender adsorber el FGF2 al vehículo de fase sólida de la presente invención, y eluir el FGF2 adsorbido con un eluyente. La adsorción del FGF2 al vehículo de fase sólida de la presente invención puede lograrse mediante un método conocido *per se*. Por ejemplo, una muestra que contiene al FGF2 (por ejemplo, cultivo de bacterias o células o sobrenadante de cultivo o sangre) es introducida en el vehículo de fase sólida de la presente invención o una composición que contiene al mismo. El FGF2 puede ser eluido usando un eluyente tal como una solución neutra. No existe limitación sobre el eluyente neutro, el cual puede tener un pH de, por ejemplo, aproximadamente 6 a aproximadamente 9, de preferencia aproximadamente 6,5 a aproximadamente 8,5, y más preferiblemente aproximadamente 7 a aproximadamente 8. La solución neutra puede comprender también, por ejemplo, una sal de potasio (por ejemplo, KCl), una sal de magnesio (por ejemplo,  $MgCl_2$ ), un agente tensoactivo (por ejemplo, Tween 20, Triton, NP40) y glicerina.

El método de purificación y concentración de la presente invención puede comprender además lavar el vehículo de fase sólida usando una solución de lavado después de la adsorción del FGF2. Ejemplos de la solución de lavado incluyen aquellas que contienen urea, un agente quelante (por ejemplo, EDTA), Tris, un ácido, un álcali, ARN de transferencia, ADN, agentes tensoactivos tales como Tween 20, sales tales como NaCl, y similares. El método de purificación y concentración de la presente invención puede comprender aún más calentar el vehículo de fase sólida. Este paso permite la regeneración y esterilización del vehículo de fase sólida.

El aptámero o complejo de la presente invención puede usarse como una sonda de detección, en particular, sonda de detección del FGF2. Un método de marcación del aptámero no es particularmente limitado, y un método conocido *per se* es aplicable. Ejemplos de dicho método incluyen la marcación con radioisótopos, la marcación con un colorante fluorescente o proteína fluorescente, y similares.

La presente descripción proporciona también un método de detección y cuantificación del FGF2. En particular, la presente invención hace posible detectar y cuantificar el FGF2 por separado de las proteínas de otras proteínas de la familia. El método de detección y cuantificación de la presente invención puede comprender medir el FGF2 usando el aptámero de la presente invención (por ejemplo, por el uso del complejo y el vehículo de fase sólida de la presente invención). El método de detección y cuantificación del FGF2 puede realizarse de la misma manera que un método inmunológico, salvo que el aptámero de la presente invención se usa en lugar de un anticuerpo. Por lo tanto, mediante el uso del aptámero de la presente invención en lugar de un anticuerpo, de la misma manera como métodos tales como el inmunoensayo de enzimas (EIA) (por ejemplo, ELISA competitiva directa, ELISA competitiva indirecta, ELISA en sandwich), el radioinmunoensayo (RIA), el inmunoensayo fluorescente (FIA), el método Western blot, el método de tinción inmunohistoquímica y el método de separación de células, pueden realizarse la detección y cuantificación. Estos métodos pueden ser útiles, por ejemplo, en la medición de los contenidos del FGF2 en organismos vivos o muestras biológicas, y en el diagnóstico de una enfermedad asociada con el FGF2.

A continuación se muestran ejemplos de realizaciones particulares para la práctica de la presente invención. Los ejemplos se proporcionan sólo para propósitos de explicación, y no se pretende que limiten el alcance de la presente invención.

## Ejemplos

Ejemplo 1: Preparación de aptámeros de arn que se unen específicamente al FGF2

En un método convencional SELEX, se usó una colección de una secuencia aleatoria de aproximadamente 30 partes - 40 partes añadida con cebadores de aproximadamente 20 partes en ambos extremos. En este caso, la longitud completa del aptámero obtenido es de aproximadamente 80 - 100 partes, y un acortamiento de la cadena fue necesario después. Sin embargo, el acortamiento de la cadena no es necesariamente simple y fácil, y la actividad disminuyó con frecuencia radicalmente. De esta manera, haciendo referencia al método SELEX hecho a la

medida desarrollado por NOXXON (Vater *et al.*, Nucleic Acids Res. 31, 2003, e130; Jarosch *et al.* Nucleic Acids Res. 34, 2006, e86), se llevó a cabo el método SELEX usando un depósito de material de ARN con una longitud de aproximadamente 30 partes que excluye la secuencia del cebador.

Las secuencias del molde de ADN y el cebador que se usaron, son como se describen a continuación:

5

Molde de ADN:

5'-TCGAG-30N-TCCCTATAGTGAGTCGTATTAGCAGCTCCACAGGCTT-3' (SEQ ID NO: 13)

Enlazador delantero:

5'-UAAUACGACUCACUAUA-3' (SEQ ID NO: 14)

10

Cebador delantero:

5'-AAGCCTGTGGAGCTGCTAATACGACTCACTATAGGGA-3' (SEQ ID NO: 15)

Puente delantero:

5'-TCCCTATAGTGAGTCGTATTA-NH<sub>2</sub>-3' (SEQ ID NO: 16)

Puente inverso:

15

5'-TCTTGTTTCAGCTTAGTTCTCTCGAG-3' (SEQ ID NO: 17)

Enlazador inverso:

5'-p-GAGAACTAAGCTGAACAAGA-NH<sub>2</sub>-3' (SEQ ID NO: 18)

20

El FGF2 humano (fabricado por Peprotech Inc.) se usó como una sustancia objetivo. El FGF2 fue inmovilizado sobre resina de agarosa (Sephacrose activada por NHS, fabricada por GE Healthcare) por acoplamiento de amino. El acoplamiento de amino se realizó según el manual de GE Healthcare. La cantidad de inmovilización se confirmó examinando la solución del FGF2 antes de la inmovilización y el sobrenadante inmediatamente después de la inmovilización por SDS-PAGE. Como resultado de la SDS-PAGE, la banda del FGF2 no se detectó del sobrenadante, lo cual confirmó que casi todo el FGF2 usado fue acoplado. Aproximadamente 290 pmoles del FGF2 fueron inmovilizados sobre aproximadamente 5 µL de resina.

25

El ARN usado en la primera serie (ARN 30N) se obtuvo formando una doble cadena de un molde de ADN químicamente sintetizado usando el cebador delantero y transcribiendo el mismo usando el kit de transcripción T7 DuraScribe (marca registrada) (fabricado por Epicentre). El ARN obtenido por este método tiene la posición 2' de la ribosa de los nucleótidos de pirimidina sustituida por fluoro. Después de la serie 2, el ADN de doble cadena se formó, y la secuencia del cebador del lado 3' fue escindida por una enzima de restricción, lo cual fue seguido por la transcripción.

30

Se añadió el depósito de material de ARN a la resina sobre la cual el FGF2 fue inmovilizado, y la mezcla se mantuvo a temperatura ambiente por 1 hora. Después, la resina se lavó con la solución A para remover el ARN no unido al FGF2. 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) y Tween 20 a 0,05%. El ARN unido al FGF2 se recuperó añadiendo el eluyente y a 95 °C por 10 minutos. Como eluyente, se usó una mezcla de urea 7 M, EDTA 3 mM y Tris 0,1 M preparada hasta pH 6,6. El ARN recuperado fue amplificado por RT-PCR, transcrito usando el kit de transcripción T7 DuraScribe (marca registrada), y usado como un grupo para la siguiente serie. Con lo anterior como la serie 1, se realizó una operación similar durante 7 series. Después de concluir el método SELEX, el producto de PCR fue clonado en un vector pGEM-T Easy (fabricado por Promega), el cual se usó para transformar la cepa DH5α de *Escherichia coli* (producida por Toyobo). El plásmido se extrajo de una sola colonia, y las secuencias de bases de 97 clones se examinaron usando un secuenciador de ADN (analizador genético 3130xl, fabricado por ABI).

35

40

Después de 7 series de SELEX, las secuencias se examinaron. De 89 clones, se hizo que 79 clones convergieran, y pudieron clasificarse en 11 tipos. Los 10 clones restantes fueron secuencias simples.

45

De las secuencias convergentes, la actividad de unión del ácido nucleico mostrado en SEQ ID NOs: 1 y 2 al FGF2 se evaluó por el método de resonancia de plasmones de superficie. En lo siguiente, las secuencias de nucleótidos mostradas en SEQ ID NOs: 1 y 2 se muestran como los IDs 1 y 2 del aptámero junto con la modificación de la posición 2' de la ribosa. Los paréntesis en cada nucleótido muestran las modificaciones en la posición 2' de la ribosa, y F es un átomo de flúor. Específicamente, c(F) es citidina en donde la posición 2' de la ribosa es sustituida por un átomo de flúor, y u(F) es uridina en donde la posición 2' de la ribosa es sustituida por un átomo de flúor.

50

El inicio de cada secuencia es 5'-terminal, y el final es 3'-terminal.

ID 1 del aptámero:

GGGAU(F)AC(F)U(F)AGGGC(F)AU(F)U(F)AAU(F)GU(F)U(F)AC(F)C(F)AGU(F)GU(F)AGU(F)C(F)U(F)C(F)GA

ID 2 del aptámero:

GGGAAAC(F)U(F)AGGGC(F)GU(F)U(F)AAC(F)GU(F)GAC(F)C(F)AGU(F)GU(F)U(F)U(F)C(F)U(F)C(F)GA

- 5 Para la medición, se usó BIAcore2000 fabricado por BIAcore y, como el chip sensor, se usó CM4 que reacciona con un grupo amino. El FGF2 humano se disolvió en la solución de inmovilización (acetato de sodio 10 mM, pH 6) a 25 – 40 µg/ml. Para la reacción de un grupo amino en el lado de la proteína y un grupo carboxilo en el lado del chip, se usaron clorhidrato de etil-3-carbodiimida y N-hidroxisuccinimida. Después de la reacción, se realizó bloqueo por clorhidrato de etanolamina. Se estableció que la cantidad inmovilizada del FGF2 es de 2500 - 4000 RU. Un aptámero para el analito se preparó hasta 0.15 µM – 0.5 µM. Como tampón corriente, se usó la solución A. Como una solución de regeneración, se usó NaCl 2 M. El FGF2 fue inmovilizado en una celda de flujo FC2, y los resultados de FC1 se restaron para dar un sensorgrama final.

- 10 La unión de las 2 secuencias se midió para encontrar una unión notable al FGF2. Un sensorgrama que muestra el estado de la unión del aptámero mostrado por los IDs del aptámero y el FGF2 humano, se muestra en la figura 1. De lo anterior, se mostró que estos ácidos nucleicos son aptámeros que se unen al FGF2.

- 15 De los 11 clones que mostraron convergencia se seleccionaron 10 clones, y se examinó si inhiben la unión del FGF2 y un receptor del FGF2 usando el método de resonancia de plasmones de superficie. Se usó BIAcore2000 fabricado por BIAcore para la medición. Como se indica en el protocolo de la compañía BIAcore, la proteína A (21181, fabricada por PIERCE) fue inmovilizada sobre un chip sensor CM5. Aproximadamente 1,000 RU de FGFR1α (IIIc), R2α (IIIc), R3 (IIIc) y R4 de humano (fabricados por R & D Systems) fusionados con el resto Fc de IgG (fabricada por R & D Systems) fueron inmovilizados cada uno sobre la misma. Como analito, se hizo fluir una mezcla de FGF2 (0.1 µM), heparina (0.1 µM) (fabricada por Pfizer) y el aptámero (0.15 µM). Antes de una prueba inhibidora, se confirmó que una mezcla de FGF2 y heparina se uniera a 4 tipos de receptores. Como resultado de la prueba, los aptámeros mostrados por los IDs 1 y 2 del aptámero mostraron una fuerte actividad inhibidora. Un sensorgrama que muestra que el aptámero mostrado por el ID 1 del aptámero que inhibe la unión del FGF2 y el FGFR1α (IIIc), 2α (IIIc), 3 (IIIc) y 4, se muestra en la figura 2.

- 20 Además, se determinó la tasa de inhibición contra cada uno de los 4 tipos de receptores. La tasa de inhibición se determinó con la cantidad de unión máxima de la mezcla de FGF2 y heparina como 0, y la cantidad de unión con un tampón de inyección solo como 100. La cantidad de unión significa aquí el valor de RU de la cima del pico del sensorgrama. Se calculó la tasa de inhibición. Los aptámeros mostrados por los IDs 1 y 2 del aptámero mostraron un alto valor de no menos del 50% para cualquier receptor. La tasa de inhibición de otros aptámeros no fue mayor del 50%. Los resultados de los mismos se muestran en la tabla 1.

Tabla 1

Tasa de inhibición de los aptámeros mostrados por los IDs 1 y 2 del aptámero que inhiben la unión del FGF2 humano y el receptor del FGF				
	Tasa de inhibición (%)			
	FGFR1α (IIIc)	FGFR2α (IIIc)	FGFR3 (IIIc)	FGFR4
ID 1 del aptámero	89%	88%	80%	75%
ID 2 del aptámero	89%	86%	75%	73%

- 35 Ejemplo 2: Acortamiento de la cadena de los aptámeros mostrados en SEQ ID NOs: 1 y 2

- Se realizó el acortamiento de la cadena de los aptámeros mostrados en SEQ ID NOs: 1 y 2. Se predijo la estructura secundaria del ARN usando el programa MFOLD (Zuker, Nucleic Acids Res. 31, 3406-3415, 2003), y el acortamiento de la cadena se realizó por referencia a la estructura. Una forma de cadena acortada se obtuvo produciendo ADN de la secuencia objetivo por síntesis química, y la transcripción de la misma usando el kit de transcripción T7 DuraScribe. En lo siguiente, las secuencias de nucleótidos (SEQ ID NOs: 3 y 7) en una forma de cadena acortada realmente producida se muestran como los IDs 3 y 7 del aptámero junto con la modificación de la posición 2' de la ribosa.

ID 3 del aptámero: aptámero de 36 nucleótidos de longitud, el cual es alterado a partir del aptámero mostrado en SEQ ID NO: 1

- 45 GGGAU(F)AC(F)U(F)AGGGC(F)AU(F)U(F)AAU(F)GU(F)U(F)AC(F)C(F)AGU(F)GU(F)AGU(F)C(F)C(F)C(F)

ID 7 del aptámero: aptámero de 35 nucleótidos de longitud, el cual es alterado a partir del aptámero mostrado en

SEQ ID NO: 2

GGGAAAC(F)U(F)AGGGC(F)GU(F)U(F)AAC(F)GU(F)GAC(F)C(F)AGU(F)GU(F)U(F)U(F)C(F)C(F)C(F)

Se examinó si estos ácidos nucleicos tienen una actividad de unión al FGF2 por el método de resonancia de plasmones de superficie como en el ejemplo 1. Los resultados de los mismos se muestran en el cuadro 2. Se encontró que los aptámeros mostrados por los IDs 3 y 7 del aptámero se unen notablemente al FGF2. Además, se examinó si los aptámeros tienen una actividad inhibidora de la unión contra la unión del FGF2 y un receptor del FGF2 por el método de resonancia de plasmones de superficie de la misma manera como en el ejemplo 1, para encontrar que los aptámeros mostrados por los IDs 3 y 7 del aptámero muestran alta inhibición.

Tabla 2

Tasa de inhibición de los aptámeros mostrados por los IDs 3 y 7 del aptámero que inhiben la unión del FGF2 humano y el receptor del FGF	
	FGFR1 $\alpha$ (IIIc)
ID 3 del aptámero	89%
ID 7 del aptámero	85%

Ejemplo 3: Especificidad del aptámero mostrada por el ID 3 del aptámero

Se examinó si el aptámero del FGF2 mostrado por el ID 3 del aptámero se une al FGF1 en la misma familia del FGF, o algunos factores de crecimiento tales como el EGF, el  $\beta$ -NGF y el VEGF, por el método de resonancia de plasmones de superficie. Las mediciones se tomaron usando el BIAcore 2000 fabricado por BIAcore. Se usó el chip SA como el chip sensor, el cual tenía estreptavidina inmovilizada sobre el mismo. Unidos al mismo fueron aproximadamente 500 RU del aptámero mostrado por el ID 3 del aptámero añadido con biotina al extremo 5' terminal. El aptámero con biotina añadida se produjo por síntesis química. Como la proteína que será el Enlazador, se usaron FGF1, EGF,  $\beta$ -NGF y VEGF fabricados por R & D Systems. Como tampón corriente, se usó la solución A usada en el ejemplo 1 añadida con cloruro de sodio hasta una concentración final de 0,3 M. Como resultado, se encontró que el aptámero mostrado por el ID 3 del aptámero se une al FGF2, pero no se une a otras proteínas. El sensorgrama del mismo se muestra en la figura 3.

De lo anterior, se encontró que el aptámero mostrado por el ID 3 del aptámero se une específicamente al FGF2.

Ejemplo 4: Alteración y modificación del aptámero de cadena acortada

Para mejorar la actividad de unión del FGF2, la estabilidad, la capacidad de suministro de fármacos y similares, los ácidos nucleicos mostrados por los IDs 3(1)-3(40) del aptámero, los IDs 4 y 4(1)—4(4) del aptámero, el ID 5 del aptámero y el ID 6 del aptámero se sintetizaron químicamente con base en el aptámero mostrado en SEQ ID NO: 3. Aquí, el aptámero mostrado por el ID 4 del aptámero es el aptámero mostrado por el ID 3(19) del aptámero, en donde un G(M) en el extremo 5'-terminal y un C(M) en el extremo 3'-terminal han sido eliminados. El aptámero mostrado por el ID 5 del aptámero es el aptámero mostrado por el ID 3(19) del aptámero, en donde un G(M) ha sido añadido en el extremo 5'-terminal y un C(M) ha sido añadido en el extremo 3'-terminal. El aptámero mostrado por el ID 6 del aptámero es el aptámero mostrado por el ID 3(19) del aptámero, en donde un A(M) solo ha sido añadido en el extremo 5'-terminal. Estos ácidos nucleicos se produjeron por síntesis química. Se examinó si los aptámeros producidos inhiben la unión del FGF2 y un receptor del FGF2 de la misma manera como en el ejemplo 1. Como se usa en la presente, la concentración de aptámero, FGF2 y heparina fue de 0.1  $\mu$ M. Como resultado del experimento, se encontró que todos los aptámeros medidos inhibieron fuertemente la unión del FGF2 y el receptor del FGFR1 $\alpha$  (IIIc). Los resultados de los mismos se muestran en la tabla 3.

Tabla 3-1

Tasa de inhibición de los aptámeros que inhiben la unión del FGF2 y el receptor del FGFR1 $\alpha$ (IIIc) en presencia de heparina	
	Tasa de inhibición (%)
ID 3(1) del aptámero	84
ID 3(2) del aptámero	89
ID 3(3) del aptámero	87
ID 3(4) del aptámero	89
ID 3(5) del aptámero	87
ID 3(6) del aptámero	78

ID 3(7) del aptámero	89
ID 3(8) del aptámero	84
ID 3(9) del aptámero	89
ID 3(10) del aptámero	89
ID 3(11) del aptámero	88
ID 3(12) del aptámero	89
ID 3(13) del aptámero	88
ID 3(14) del aptámero	87
ID 3(15) del aptámero	86
ID 3(16) del aptámero	87
ID 3(17) del aptámero	88
ID 3(18) del aptámero	89
ID 3(19) del aptámero	93
ID 3(20) del aptámero	96
ID 3(21) del aptámero	97
ID 3(22) del aptámero	98
ID 3(23) del aptámero	91
ID 3(24) del aptámero	90
ID 3(25) del aptámero	90
ID 3(26) del aptámero	99
ID 3(27) del aptámero	99
ID 3(28) del aptámero	91
ID 3(29) del aptámero	91
ID 3(30) del aptámero	99

Tabla 3-2

Tasa de inhibición de los aptámeros que inhiben la unión del FGF2 y el receptor del FGFR1 $\alpha$ (iic) en presencia de heparina (continuación)	
	Tasa de inhibición (%)
ID 3(31) del aptámero	91
ID 3(32) del aptámero	91
ID 3(33) del aptámero	90
ID 3(34) del aptámero	91
ID 3(35) del aptámero	84
ID 3(36) del aptámero	98
ID 3(37) del aptámero	97
ID 3(38) del aptámero	97
ID 3(39) del aptámero	97
ID 3(40) del aptámero	97
ID 4 del aptámero	95
ID 4(1) del aptámero	93
ID 4(2) del aptámero	94
ID 4(3) del aptámero	96
ID 4(4) del aptámero	96
ID 5 del aptámero	94
ID 6 del aptámero	93

De lo anterior, se mostró que todos los aptámeros mostrados por los identificadores (IDs) del aptámero mencionados anteriormente tienen una alta actividad inhibidora contra la unión del FGF2 y un receptor del FGF.

Las secuencias respectivas se muestran a continuación. La letra mayúscula muestra al ARN, la letra minúscula muestra al ADN, e idT muestra el dT invertido. El paréntesis en cada nucleótido muestra la modificación de la posición 2' del mismo, F muestra un átomo de flúor, y M muestra un grupo O-metilo. s muestra un enlace de fosforotioato. C6 muestra al enlazador de  $-(CH_2)_6-$ , y ssH muestra al enlazador de ssH  $(-CH_2-CH_2-O-CO-NH-(CH_2)_6-)$ . PEG40TS2 es polietilenglicol tipo TS de 2 ramas que tiene un peso molecular de 40000 (SUNBRIGHT GL2-400TS, fabricado por NOF CORPORATION), PEG80TS4 es polietilenglicol tipo TS de 4 ramas que tiene un peso molecular de 80000 (SUNBRIGHT GL4-800TS, fabricado por NOF CORPORATION), Y-NHS-40K es PEG en forma de Y NHS Esyer (Y-NHS-40K, fabricado por JenKem Technology USA) que tiene un peso molecular de 40000, ME-100TS es de tipo TS (SUNBRIGHT ME-100TS, fabricado por NOF CORPORATION) que tiene un peso molecular de 10000, y PTE-100CS es del tipo de 4 ramas (SUNBRIGHT PTE-100CS, fabricado por NOF CORPORATION) que tiene un peso molecular de 10000. Las secuencias de nucleótidos de los IDs 3(1)-(40) del aptámero libres del resto del enlazador y el resto modificado se muestran cada una en SEQ ID NO: 3 y, del mismo modo, las secuencias de nucleótidos de los IDs 4 y 4(1)-(4) del aptámero y los IDs 5 y 6 del aptámero se representan cada una por SEQ ID NOs: 4 - 6.

ID 3(1) del aptámero

GGGAU(F)AC(F)U(F)AGGGC(F)A(M)U(F)U(F)A(M)A(M)U(F)G(M)U(F)U(F)AC(F)C(F)AGU(F)GU(F)AGU(F)C(F)C(F)C(F)

ID 3(2) del aptámero

G(M)G(M)G(M)A(M)U(F)AC(F)U(F)AGGGC(F)AU(F)U(F)AAU(F)GU(F)U(F)AC(F)C(F)AGU(F)GU(F)AGU(F)C(F)C(F)C(F)

ID 3(3) del aptámero

GGGAU(F)AC(F)U(F)AGG(M)GC(F)AU(F)U(F)AAU(F)GU(F)U(F)AC(F)C(F)AGU(F)GU(F)AGU(F)C(F)C(F)C(F)

ID 3(4) del aptámero

GGGAU(F)AC(F)U(F)AG(M)GGC(F)AU(F)U(F)AAU(F)GU(F)U(F)AC(F)C(F)AGU(F)GU(F)AGU(F)C(F)C(F)C(F)

ID 3(5) del aptámero

GGGAU(F)AC(F)U(F)A(M)GGGC(F)AU(F)U(F)AAU(F)GU(F)U(F)AC(F)C(F)AGU(F)GU(F)AGU(F)C(F)C(F)C(F)

ID 3(6) del aptámero

GGGAU(F)AC(F)U(F)AGGGC(F)AU(F)U(F)AAU(F)GU(F)U(F)A(M)C(F)C(F)AGU(F)GU(F)AGU(F)C(F)C(F)C(F)

ID 3(7) del aptámero

GGGAU(F)AC(F)U(F)AGGGC(F)AU(F)U(F)AAU(F)GU(F)U(F)AC(F)C(F)A(M)GU(F)GU(F)AGU(F)C(F)C(F)C(F)

ID 3(8) del aptámero

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

ID 3(9) del aptámero

GGGAU(F)A(M)C(F)U(F)AGGGC(F)AU(F)U(F)AAU(F)GU(F)U(F)AC(F)C(F)AGU(F)GU(F)AGU(F)C(F)C(F)C(F)

ID 3(10) del aptámero

GGGAU(F)AC(F)U(F)AGGGC(F)AU(F)U(F)AAU(F)GU(F)U(F)AC(F)C(F)AGU(F)GU(F)AG(M)U(F)C(F)C(F)C(F)

ID 3(11) del aptámero

GGGAU(F)AC(F)U(F)AGGGC(F)AU(F)U(F)AAU(F)GU(F)U(F)AC(F)C(F)AGU(F)GU(F)A(M)GU(F)C(F)C(F)C(F)

ID 3(12) del aptámero

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

ID 3(13) del aptámero

G(M)G(M)G(M)A(M)U(F)AC(F)U(F)A(M)G(M)G(M)GC(F)A(M)U(M)U(M)A(M)A(M)U(M)G(M)U(F)U(F)A(M)C(F)C(F)A(M)GU(F)GU(F)AGU(F)C(F)C(F)C(F)

ID 3(14) del aptámero

5 G(M)G(M)G(M)A(M)U(F)AC(F)U(F)A(M)G(M)G(M)GC(F)A(M)U(F)U(F)A(M)A(M)U(F)G(M)U(F)U(M)A(M)C(F)C(F)A(M)GU(F)GU(F)AGU(F)C(F)C(F)C(F)

ID 3(15) del aptámero

G(M)G(M)G(M)A(M)U(F)AC(F)U(F)A(M)G(M)G(M)GC(F)A(M)U(F)U(F)A(M)A(M)U(F)G(M)U(F)U(F)A(M)C(M)C(M)A(M)GU(F)GU(F)AGU(F)C(F)C(F)C(F)

ID 3(16) del aptámero

10 G(M)G(M)G(M)A(M)U(F)AC(M)U(F)A(M)G(M)G(M)GC(F)A(M)U(F)U(F)A(M)A(M)U(F)G(M)U(F)U(F)A(M)C(F)C(F)A(M)GU(F)GU(F)AGU(F)C(F)C(F)C(F)

ID 3(17) del aptámero

G(M)G(M)G(M)A(M)U(M)AC(F)U(F)A(M)G(M)G(M)GC(F)A(M)U(F)U(F)A(M)A(M)U(F)G(M)U(F)U(F)A(M)C(F)C(F)A(M)GU(F)GU(F)AGU(F)C(F)C(F)C(F)

15 ID 3(18) del aptámero

G(M)G(M)G(M)A(M)U(M)A(M)C(M)U(F)A(M)G(M)G(M)GC(M)A(M)U(M)U(F)A(M)A(M)U(M)G(M)U(F)U(M)A(M)C(M)C(M)A(M)GU(F)GU(F)A(M)G(M)U(M)C(M)C(M)C(M)

ID 3(19) del aptámero

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

ID 3(20) del aptámero

idT-

G(M)G(M)G(M)A(M)U(M)A(M)C(M)U(F)A(M)G(M)G(M)GC(M)A(M)U(M)U(F)A(M)A(M)U(M)G(M)U(F)U(M)A(M)C(M)C(M)A(M)GU(F)GU(F)A(M)G(M)U(M)C(M)C(M)C(M)

25 ID 3(21) del aptámero

GL2-400TS-C6-

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

ID 3(22) del aptámero

30 idT-

G(M)G(M)G(M)A(M)U(M)A(M)C(M)U(F)A(M)G(M)G(M)GC(M)A(M)U(M)U(F)A(M)A(M)U(M)G(M)U(F)U(M)A(M)C(M)C(M)A(M)GU(F)GU(F)A(M)G(M)U(M)C(M)C(M)C(M)-C6-GL2-400TS

ID 3(23) del aptámero

35 G(M)G(M)G(M)A(M)U(M)A(M)C(M)U(F)A(M)G(M)G(M)GC(M)A(M)U(M)U(F)A(M)A(M)U(M)G(M)U(F)U(M)A(M)C(M)C(M)A(M)GU(F)GU(F)A(M)G(M)U(M)C(M)C(M)C(M)

ID 3(24) del aptámero

G(M)G(M)G(M)A(M)U(M)A(M)C(M)U(F)A(M)G(M)G(M)GC(M)A(M)U(M)U(F)A(M)A(M)U(M)G(M)U(F)U(M)A(M)C(M)C(M)A(M)GU(F)GU(F)A(M)G(M)U(M)C(M)C(M)C(M)

ID 3(25) del aptámero

40 G(M)G(M)G(M)A(M)U(M)A(M)C(M)U(F)A(M)G(M)G(M)G(F)C(M)A(M)U(M)U(F)A(M)A(M)U(M)G(M)U(F)U(M)A(M)C(M)C(M)A(M)GU(F)GU(F)A(M)G(M)U(M)C(M)C(M)C(M)

ID 3(26) del aptámero

G(M)G(M)G(M)A(M)U(M)A(M)C(M)U(F)A(M)G(M)G(M)GC(M)A(M)U(M)U(F)A(M)A(M)U(M)G(M)U(F)U(M)A(M)C(M)C(M)A(M)G(F)U(F)GU(F)A(M)G(M)U(M)C(M)C(M)C(M)

ID 3(27) del aptámero

G(M)G(M)G(M)A(M)U(M)A(M)C(M)U(F)A(M)G(M)G(M)GC(M)A(M)U(M)U(F)A(M)A(M)U(M)G(M)U(F)U(M)A(M)C(M)C(M)A(M)GU(F)G(F)U(F)A(M)G(M)U(M)C(M)C(M)C(M)

ID 3(28) del aptámero

5 G(M)G(M)G(M)A(M)U(M)A(M)C(M)U(F)A(M)G(M)G(M)sGC(M)A(M)U(M)U(F)A(M)A(M)U(M)G(M)U(F)U(M)A(M)C(M)C(M)A(M)GU(F)GU(F)A(M)G(M)U(M)C(M)C(M)C(M)

ID 3(29) del aptámero

G(M)G(M)G(M)A(M)U(M)A(M)C(M)U(F)A(M)G(M)G(M)GsC(M)A(M)U(M)U(F)A(M)A(M)U(M)G(M)U(F)U(M)A(M)C(M)C(M)A(M)GU(F)GU(F)A(M)G(M)U(M)C(M)C(M)C(M)

10 ID 3(30) del aptámero

G(M)G(M)G(M)A(M)U(M)A(M)C(M)U(F)A(M)G(M)G(M)GC(M)A(M)U(M)U(F)A(M)A(M)U(M)G(M)U(F)U(M)A(M)C(M)C(M)A(M)sGU(F)GU(F)A(M)G(M)U(M)C(M)C(M)C(M)

ID 3(31) del aptámero

15 G(M)G(M)G(M)A(M)U(M)A(M)C(M)U(F)A(M)G(M)G(M)GC(M)A(M)U(M)U(F)A(M)A(M)U(M)G(M)U(F)U(M)A(M)C(M)C(M)A(M)GsU(F)GU(F)A(M)G(M)U(M)C(M)C(M)C(M)

ID 3(32) del aptámero

G(M)G(M)G(M)A(M)U(M)A(M)C(M)U(F)A(M)G(M)G(M)GC(M)A(M)U(M)U(F)A(M)A(M)U(M)G(M)U(F)U(M)A(M)C(M)C(M)A(M)GU(F)sGU(F)A(M)G(M)U(M)C(M)C(M)C(M)

ID 3(33) del aptámero

20 G(M)G(M)G(M)A(M)U(M)A(M)C(M)U(F)A(M)G(M)G(M)GC(M)A(M)U(M)U(F)A(M)A(M)U(M)G(M)U(F)U(M)A(M)C(M)C(M)A(M)GU(F)GsU(F)A(M)G(M)U(M)C(M)C(M)C(M)

ID 3(34) del aptámero

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

25 ID 3(35) del aptámero

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

ID 3(36) del aptámero

30 GL4-800TS-C6-  
G(M)G(M)G(M)A(M)U(M)A(M)C(M)U(F)A(M)G(M)G(M)GC(M)A(M)U(M)U(F)A(M)A(M)U(M)G(M)U(F)U(M)A(M)C(M)C(M)A(M)GU(F)GU(F)A(M)G(M)U(M)C(M)C(M)C(M)-idT

ID 3(37) del aptámero

35 Y-NHS-40K-ssH-  
G(M)G(M)G(M)A(M)U(M)A(M)C(M)U(F)A(M)G(M)G(M)GC(M)A(M)U(M)U(F)A(M)A(M)U(M)G(M)U(F)U(M)A(M)C(M)C(M)A(M)GU(F)GU(F)A(M)G(M)U(M)C(M)C(M)C(M)-idT

ID 3(38) del aptámero

ME-100TS-C6-  
G(M)G(M)G(M)A(M)U(M)A(M)C(M)U(F)A(M)G(M)G(M)GC(M)A(M)U(M)U(F)A(M)A(M)U(M)G(M)U(F)U(M)A(M)C(M)C(M)A(M)GU(F)GU(F)A(M)G(M)U(M)C(M)C(M)C(M)-idT

40 ID 3(39) del aptámero

PTE-100CS-C6-  
G(M)G(M)G(M)A(M)U(M)A(M)C(M)U(F)A(M)G(M)G(M)GC(M)A(M)U(M)U(F)A(M)A(M)U(M)G(M)U(F)U(M)A(M)C(M)C(M)A(M)GU(F)GU(F)A(M)G(M)U(M)C(M)C(M)C(M)-idT

ID 3(40) del aptámero

GL2-400TS-ssH-

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

5 ID 4 del aptámero: forma alterada del aptámero mostrada por el ID 3(19) del aptámero y que tiene una longitud de 34 nucleótidos

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

ID 4(1) del aptámero

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

ID 4(2) del aptámero

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

ID 4(3) del aptámero

15 G(M)G(M)A(M)U(M)A(M)C(M)U(F)A(M)G(M)G(M)G(F)C(M)A(M)U(M)U(F)A(M)A(M)U(M)G(M)U(F)U(M)A(M)C(M)C(M)A(M)GU(F)sGU(F)A(M)G(M)U(M)C(M)C(M)-idT

ID 4(4) del aptámero

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

20 ID 5 del aptámero: forma alterada del aptámero mostrada por el ID 3(19) del aptámero y que tiene una longitud de 38 nucleótidos

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

25 ID 6 del aptámero: forma alterada del aptámero mostrada por el ID 3(19) del aptámero y que tiene una longitud de 37 nucleótidos

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

Ejemplo 5: Evaluación de la actividad inhibidora del aptámero sobre la proliferación de células dependiente del fgf2 usando células endoteliales humanas de la vena umbilical

30 Se sembraron células endoteliales humanas de la vena umbilical (HUVEC) en una placa de fondo plano de 96 pocillos a  $5 \times 10^3$  células por cavidad, y se cultivaron durante la noche usando un kit de medio EGM-2 Bullet para células endoteliales (CC-3162, fabricado por Lonza) que contenía suero de bovino fetal a 2% y factores de crecimiento. Después, el medio se desechó, las células se lavaron dos veces con tampón de PBS, y se añadió una mezcla del aptámero mostrada por el ID 3(21) del aptámero (5, 2.5, 1, 0.5 nM) y FGF2 (concentración final de 0.5 nM), disuelta en un medio exclusivamente para células endoteliales que contenía suero de bovino fetal a 2%.

35 Después de 72 horas, el número de células viables se examinó usando el kit 8 de conteo de células. Para la medición de la absorbancia, se usó un lector de microplacas (450 nm). Se midió una muestra a  $n = 3$ . Como control positivo, se usó el mAb de ratón (Ab-3) básico (3H3) anti-FGF de anticuerpos anti-FGF2 (fabricado por Calbiochem). Con el valor de la DO por cavidad obtenido por la adición del FGF2 solo y el cultivo de las células por 3 días como

40 0% de actividad inhibidora, y el de las células obtenido por el cultivo libre de FGF2 por 3 días como 100% de actividad inhibidora, la actividad inhibidora del aptámero se calculó a partir del valor de la DO por cavidad obtenido por cultivo con la adición de una mezcla de FGF2 y el aptámero. Como resultado, se mostró que el aptámero mostrado por el ID 3(21) del aptámero tiene una alta actividad inhibidora contra el FGF2. El valor de la IC50 fue de aproximadamente 1.0 nM. Los resultados se muestran en la tabla 4.

45

Tabla 4

Supresión del crecimiento de las células huvec por el aptámero mostrada por el id 3(21) del aptámero con la adición del FGF2	
	Tasa de inhibición (%)
-	100
FGF2 (500 pM)	0
3H 3 (25 nM) + FGF2 (500 pM)	100
3H 3 (5 nM) + FGF2 (500 pM)	30
3H 3 (1 nM) + FGF2 (500 pM)	8.5
ID 3(21) del aptámero (5 nM) + FGF2 (500 pM)	100
ID 3(21) del aptámero (2.5 nM) + FGF2 (500 pM)	86
ID 3(21) del aptámero (1 nM) + FGF2 (500 pM)	47
ID 3(21) del aptámero (0.5 nM) + FGF2 (500 pM)	0
Secuencia revuelta (5 nM) + FGF2 (500 pM)	11
"-" significa sin la adición del FGF2.	

De lo anterior, se sugirió que el aptámero mostrado por el ID 3(21) del aptámero inhibe la angiogénesis.

- 5 Mediante un método similar al anterior, salvo que la placa de fondo plano de 96 pocillos se cambió por una placa recubierta de colágeno, se evaluó la actividad de varios aptámeros. La concentración del FGF2 añadido fue de 0,58 nM. Los resultados de la misma se muestran en el cuadro 5. Como un ARN control negativo, se usó la secuencia Macugen (marca comercial registrada) sin la adición de PEG, y con la modificación de C6 del extremo 5'-terminal y la modificación de idT del extremo 3'-terminal.

Tabla 5

Valor de la IC50 del aptámero que suprime el crecimiento de las células huvec con la adición del FGF2	
ID del aptámero	IC50 (nM)
3(8)	27
3(12)	21
3(13)	15
3(14)	12
3(15)	14
3(16)	7,9
3(18)	2,6
3(23)	5,3
3(24)	7,3
3(25)	5,1
3(26)	3,0
3(27)	3,7
3(28)	4,0
3(29)	3,1
3(30)	3,3
3(31)	10
3(32)	4,0
3(33)	4,0
4	5,0
4(1)	3,8
4(2)	5,1

4(3)	4,6
4(4)	4,5
5	2,6
6	3,1
ARN control negativo	> 400

De lo anterior, se sugirió que los aptámeros mostrados por los identificadores del aptámero mencionados anteriormente, inhiben de igual manera la angiogénesis.

5 Ejemplo 6: Evaluación de la actividad inhibidora del aptámero sobre la proliferación de células dependiente del fgf2 usando células endoteliales humanas de la vena umbilical – 2

Mediante un método similar al del ejemplo 5, se midió la actividad inhibidora de los aptámeros mostrados por los IDs 8 - 12 del aptámero. Los resultados de la misma se muestran en el cuadro 6.

Las secuencias de nucleótidos de los IDs 8 - 12 del aptámero se muestran en SEQ ID NOs: 8 - 12, respectivamente.

ID 8 del aptámero

10 NH2-  
C(M)G(M)G(M)A(M)U(M)A(M)C(M)U(F)A(M)G(M)G(M)GC(M)A(M)U(M)U(F)A(M)A(M)U(M)G(M)U(F)U(M)A(M)C(M)  
C(M)A(M)GU(F)GU(F)A(M)G(M)U(M)C(M)C(M)G(M)-idT

ID 9 del aptámero

15 NH2-  
C(M)C(M)G(M)A(M)U(M)A(M)C(M)U(F)A(M)G(M)G(M)GC(M)A(M)U(M)U(F)A(M)A(M)U(M)G(M)U(F)U(M)A(M)C(M)  
C(M)A(M)GU(F)GU(F)A(M)G(M)U(M)C(M)G(M)G(M)-idT

ID 10 del aptámero

G(M)G(M)G(M)A(M)U(M)A(M)C(M)U(F)A(M)G(M)G(M)GC(M)G(M)U(M)U(F)A(M)A(M)C(M)G(M)U(F)U(M)A(M)C(M)  
C(M)A(M)GU(F)GU(F)A(M)G(M)U(M)C(M)C(M)C(M)

20 ID 11 del aptámero

G(M)G(M)G(M)A(M)U(M)A(M)C(M)U(F)A(M)G(M)G(M)GC(M)C(M)U(M)U(F)A(M)A(M)G(M)G(M)U(F)U(M)A(M)C(M)  
C(M)A(M)GU(F)GU(F)A(M)G(M)U(M)C(M)C(M)C(M)

ID 12 del aptámero

25 G(M)G(M)G(M)A(M)U(M)A(M)C(M)U(F)A(M)G(M)G(M)GC(M)A(M)U(M)U(F)U(M)A(M)U(M)G(M)U(F)U(M)A(M)C(M)  
C(M)A(M)GU(F)GU(F)A(M)G(M)U(M)C(M)C(M)C(M)

Tabla 6

Valor de la IC50 del aptámero que suprime el crecimiento de las células HUVEC con la adición del FGF2	
ID del aptámero	IC50 (nM)
ID 8 del aptámero	5,6
ID 9 del aptámero	3,7
ID 10 del aptámero	4,9
ID 11 del aptámero	13
ID 12 del aptámero	2,3
ID 3(19) del aptámero	3,4

Ejemplo 7: Prueba del modelo de angiogénesis en el ratón

30 Se inyectó Matrigel que contiene citrato de sodio a 0,76% (concentración final) (BD Matrigel™) y que contiene FGF-2 humano (fabricado por R & D Systems) por ruta subcutánea a ratones C57BL/6J (hembras) de 8 semanas bajo anestesia. Después de 7 días, se aisló el Matrigel, y el nivel de angiogénesis se evaluó con base en el nivel de hemoglobina en el Matrigel. El nivel de hemoglobina se cuantificó por el método de cianmethemoglobina usando un

kit de reactivo Drabkin. El aptámero se disolvió en un tampón de fosfato que contenía cloruro de magnesio 1 mM, y se administró por ruta intraperitoneal una vez al día inmediatamente después de la administración subcutánea del Matrigel. El grupo de administración se muestra en el cuadro 7, y los resultados se muestran en el cuadro 8. Se observó inhibición notable de la angiogénesis en el grupo de 1 mg/kg del aptámero. De lo anterior, se confirmó que el aptámero de la presente invención muestra también una fuerte actividad inhibidora de la angiogénesis en el modelo animal.

Tabla 7

Explicación del grupo de administración						
	Grupo de administración	FGF-2 (µg)	Dosis de aptámero (mg/kg)	Ruta de Administración	Frecuencia de Administración	Número de animales (ratón)
1	Grupo control	0	0	intraperitoneal	una vez al día	3
2	Grupo de administración disolvente	1	0	intraperitoneal	una vez al día	3
3	Grupo de baja dosis, ID 3(22) del aptámero	1	0.1	intraperitoneal	una vez al día	3
4	Grupo de alta dosis, ID 3(22) del aptámero	1	1	intraperitoneal	una vez al día	3

Tabla 8

Resultados de la prueba del modelo de angiogénesis en el ratón		
	Grupo de administración	Cantidad de hemoglobina (mg/mL)
1	Grupo control	0,19
2	Grupo de administración de disolvente	2,2
3	Grupo de baja dosis, ID 3(22) del aptámero	1,3
4	Grupo de alta dosis, ID 3(22) del aptámero	0,29

Esta solicitud se basa en la solicitud de patente No. 2014-60966 (fecha de presentación: 24 de marzo de 2014) presentada en Japón, cuyo contenido se abarca enteramente en la presente.

#### Aplicación industrial

El aptámero o complejo de la presente invención puede ser útil como un medicamento, o un agente de diagnóstico o un reactivo para enfermedades tales como una enfermedad implicada en la angiogénesis, enfermedad ósea - articular, dolor, y similares. El aptámero y el complejo de la presente invención también pueden ser útiles para la purificación y concentración del FGF2, la marcación del FGF2, así como la detección y cuantificación del FGF2.

#### Listado de secuencias

<110> RIBOMIC INC.

<120> Aptámero para FGF2 y uso del mismo

<130> 092327

<150> JP 2014-60966

<151> 24-03-2014

<160> 18

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 38

<212> ARN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Aptámero contra FGF2

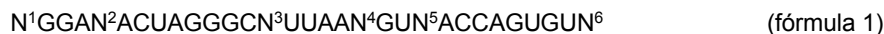
	<400> 1 gggauacuag ggc <u>au</u> ua <u>aug</u> uuaccagugu agucucga	38
5	<210> 2 <211> 37 <212> ARN <213> Secuencia Artificial	
10	<220> <223> Aptámero contra FGF2	
	<400> 2 gggaaacuag ggc <u>gu</u> ua <u>acg</u> ugaccagugu uucucga	37
15	<210> 3 <211> 36 <212> ARN <213> Secuencia Artificial	
20	<220> <223> Aptámero contra FGF2	
	<400> 3 gggauacuag ggc <u>au</u> ua <u>aug</u> uuaccagugu aguc <u>cc</u>	36
25	<210> 4 <211> 34 <212> ARN <213> Secuencia Artificial	
30	<220> <223> Aptámero contra FGF2	
	<400> 4 gg <u>au</u> acuag g <u>ca</u> ua <u>aug</u> uaccagug <u>ua</u> gucc	34
35	<210> 5 <211> 38 <212> ARN <213> Secuencia Artificial	
40	<220> <223> Aptámero contra FGF2	
	<400> 5 ggggauacua ggg <u>ca</u> ua <u>au</u> guuaccagug uaguc <u>ccc</u>	38
45	<210> 6 <211> 37 <212> ARN <213> Secuencia Artificial	
50	<220> <223> Aptámero contra FGF2	
	<400> 6 agggauacua ggg <u>ca</u> ua <u>au</u> guuaccagug uaguc <u>ccc</u>	37
55	<210> 7 <211> 35 <212> ARN <213> Secuencia Artificial	
60	<220> <223> Aptámero contra FGF2	
65		

	<400> 7 gggaaacuag ggcguuaacg ugaccagugu uuccc	35
5	<210> 8 <211> 36 <212> ARN <213> Secuencia Artificial	
10	<220> <223> Aptámero contra FGF2	
15	<400> 8 cggauacuag ggcauuuauug uuaccagugu aguccg	36
20	<210> 9 <211> 36 <212> ARN <213> Secuencia Artificial	
25	<220> <223> Aptámero contra FGF2	
30	<400> 9 ccgauacuag ggcauuuauug uuaccagugu agucgg	36
35	<210> 10 <211> 36 <212> ARN <213> Secuencia Artificial	
40	<220> <223> Aptámero contra FGF2	
45	<400> 10 gggauacuag ggcguuaacg uuaccagugu aguccc	36
50	<210> 11 <211> 36 <212> ARN <213> Secuencia Artificial	
55	<220> <223> Aptámero contra FGF2	
60	<400> 11 gggauacuag ggccuuuauug uuaccagugu aguccc	36
65	<210> 12 <211> 36 <212> ARN <213> Secuencia Artificial	
70	<220> <223> Aptámero contra FGF2	
75	<400> 12 gggauacuag ggcauuuauug uuaccagugu aguccc	36
80	<210> 13 <211> 72 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
85	<220> <223> ADN molde	

<220>  
 <221> característica\_misc  
 <222> (6)..(35)  
 5 <223> Cada "n" independientemente se representa por a, g, t o c.  
  
 <400> 13  
 tcgagnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnntccct atagtgagtc gtattagcag 60  
  
 ctccacaggc tt 72  
  
 10 <210> 14  
 <211> 17  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 15 <220>  
 <223> Enlazador posterior  
  
 <400> 14  
 20 uaauacgacu cacuaa 17  
  
 <210> 15  
 <211> 37  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 25  
 <220>  
 <223> Cebador posterior  
  
 <400> 15  
 30 aagcctgtgg agctgcta acgactcact atagga 37  
  
 <210> 16  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 35 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Puente posterior  
  
 <400> 16  
 40 tccctatagt gagtcgtatt a 21  
  
 <210> 17  
 <211> 25  
 45 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Puente inverso  
 50  
 <400> 17  
 tctgttcag ctagttctc tcgag 25  
  
 <210> 18  
 55 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 60 <223> Enlazador inverso  
  
 <400> 18  
 gagaactaag ctgaacaaga 20  
  
 65

## REIVINDICACIONES

1. Un aptámero que se une al FGF2, que comprende una secuencia de nucleótidos representada por la fórmula (1) siguiente (en donde el uracilo es opcionalmente timina), y el cual está son los siguientes (a) o (b):



5  $N^1$  y  $N^6$  son cada uno independientemente cualquiera de 0 a varias bases,  $N^2$ ,  $N^3$ ,  $N^4$  y  $N^5$  son independientemente cualquier base,

(a) un aptámero en donde, en los nucleótidos contenidos en el aptámero,

(i) la posición 2' de la ribosa de cada nucleótido de pirimidina es un átomo de flúor,

(ii) la posición 2' de la ribosa de cada nucleótido de purina es un grupo hidroxilo;

10 (b) el aptámero de (a), en donde:

(i) el átomo de flúor en la posición 2' de la ribosa de cada nucleótido de pirimidina es independientemente no sustituido, o sustituido por un átomo o grupo seleccionado del grupo que consiste en un átomo de hidrógeno, un grupo hidroxilo y un grupo metoxi,

15 (ii) el grupo hidroxilo en la posición 2' de la ribosa de cada nucleótido de purina es independientemente no sustituido, o sustituido por un átomo o grupo seleccionado del grupo que consiste en un átomo de hidrógeno, un grupo metoxi y un átomo de flúor.

2. El aptámero según la reivindicación 1, en donde

$N^1$  es G, GG, AG, C o espacio intermedio,

$N^2$  es A o U,

20  $N^3$  es G, C o A,

$N^4$  es G, C o U,

$N^5$  es G o U, y  $N^6$  es  $UUCN^{61}$  o  $AGUCN^{62}$ , en donde  $N^{61}$  y  $N^{62}$  son cada uno independientemente cualquiera de 0 a varias bases.

25 3. El aptámero según la reivindicación 1 o 2, que comprende una secuencia de nucleótidos representada por las siguientes fórmulas (2) o (3):



4. El aptámero según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende una secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 2 o 7.

30 5. El aptámero según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende una secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 1, 3, 4, 5, 6, 8, 10 u 11.

6. El aptámero según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde 1 o varios nucleótidos son sustituidos, eliminados, insertados o añadidos, el cual es:

(a) un aptámero en donde, en los nucleótidos contenidos en el aptámero,

35 (i) la posición 2' de la ribosa de cada nucleótido de pirimidina es un átomo de flúor,

(ii) la posición 2' de la ribosa de cada nucleótido de purina es un grupo hidroxilo;

(b) el aptámero de (a), en donde:

40 (i) el átomo de flúor en la posición 2' de la ribosa de cada nucleótido de pirimidina es independientemente no sustituido, o sustituido por un átomo o grupo seleccionado del grupo que consiste en un átomo de hidrógeno, un grupo hidroxilo y un grupo metoxi,

(ii) el grupo hidroxilo en la posición 2' de la ribosa de cada nucleótido de purina es independientemente no sustituido, o sustituido por un átomo o grupo seleccionado del grupo que consiste en un átomo de hidrógeno, un grupo metoxi y un átomo de flúor.

7. El aptámero según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, el cual tiene una longitud de nucleótidos de no más de 45.
8. El aptámero según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, el cual inhibe la unión del FGF2 y un receptor del FGF.
- 5 9. El aptámero según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde al menos un nucleótido es modificado.
10. Un complejo que comprende el aptámero de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 y una sustancia funcional.
11. El complejo según la reivindicación 10, en donde la sustancia funcional es una sustancia de afinidad, una sustancia de marcación, una enzima, un vehículo de liberación de fármacos o un fármaco.
- 10 12. Un medicamento que comprende el aptámero según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 o el complejo de las reivindicaciones 10 u 11.
13. Un medicamento para el uso en el tratamiento o profilaxis de una enfermedad implicada en la angiogénesis anormal, enfermedad articular ósea o dolor, que comprende el aptámero de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 o el complejo de la reivindicación 10 u 11.
- 15 14. El aptámero según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 o el complejo según la reivindicación 10 u 11, para uso para el tratamiento o profilaxis de una enfermedad implicada en la angiogénesis anormal, enfermedad articular ósea o dolor.

Fig. 1

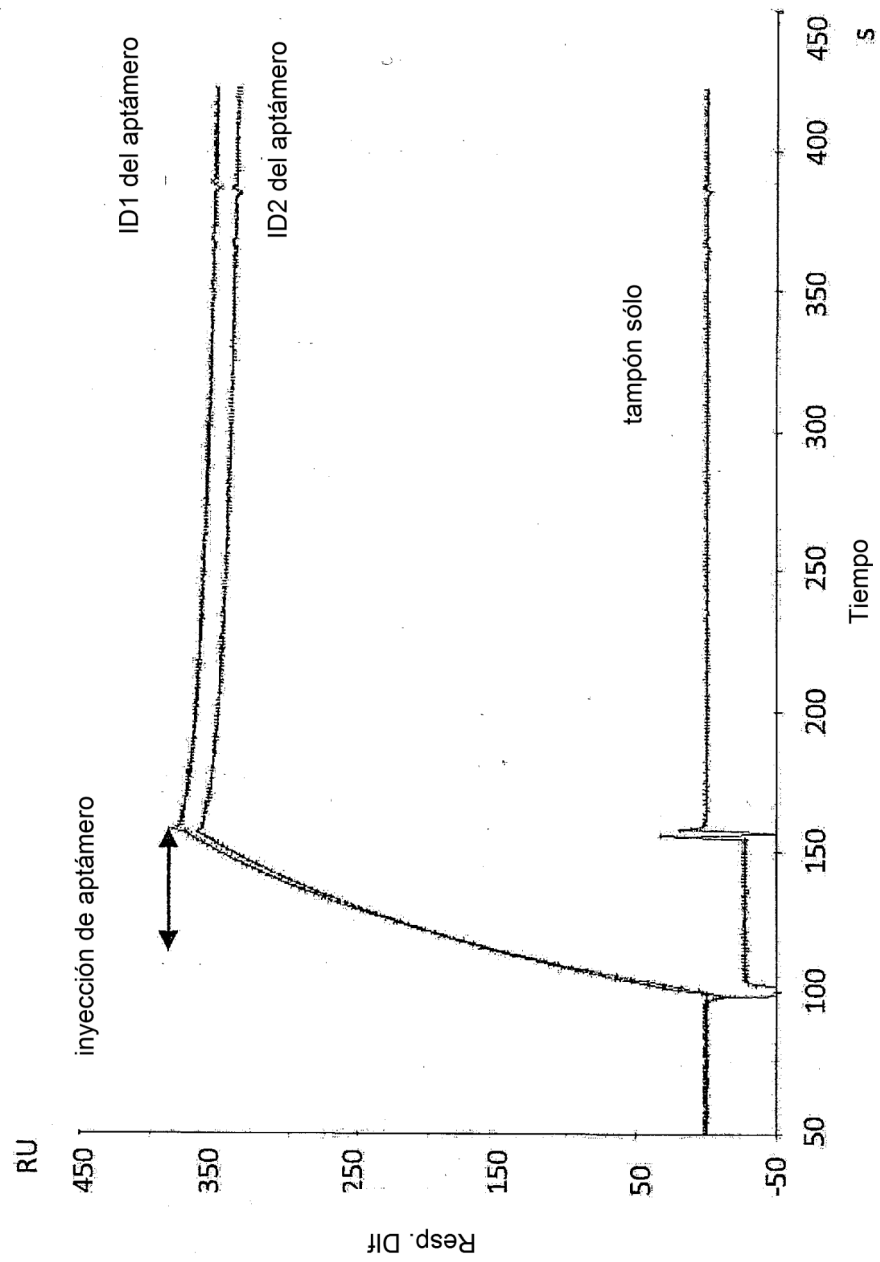


Fig. 2

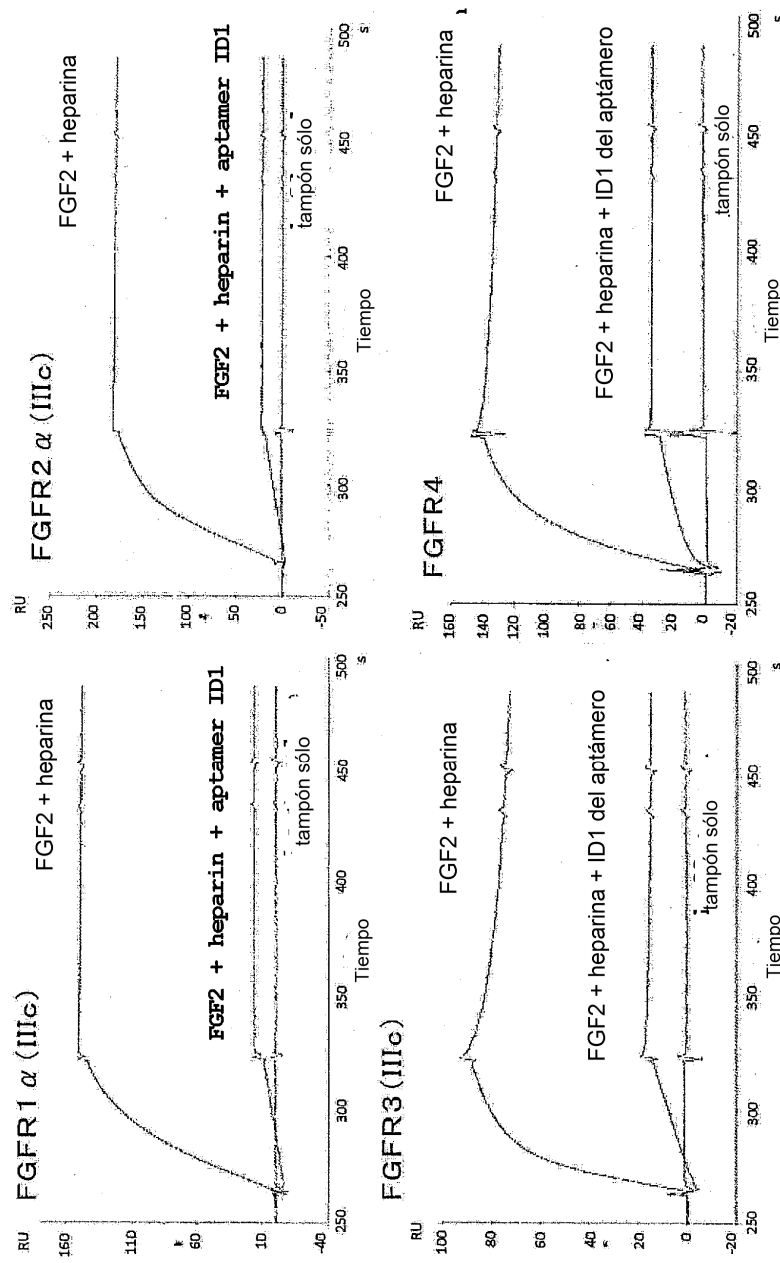


Fig. 3

