



No. 11-180116- -00000-0000

Fecha: 2011-12-28 15:28:15 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 266



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

República de Colombia
Ministerio de Comercio, Industria y Turismo

PROPIEDAD
INDUSTRIAL

Delegatura de Propiedad Industrial
División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD DE

PATENTE DE INVENCION
PCT ENTRADA EN FASE NACIONAL

21. EXPEDIENTE No. _____

54. TITULO: APTAMERO PARA QUIMASA Y SU USO

52. CLASIFICACION INTERNACIONAL: C12N 15/09, A61P 9/00, A61P
19/04, A61P 43/00, C12Q
1/68, A61K 31/7088

71. SOLICITANTE: 1. RIBOMIC INC.
2. OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD.

DOMICILIO: 1. 16-13, Shirokanedai 3-chome, Minato-
ku, Tokyo 1080071 – JAPON
2. 9, Kanda-Tsukasamachi 2-chome,
Chiyoda-ku, Tokyo 1018535 - JAPON

74. APODERADO: Dra. MARGARITA CASTELLANOS A.

22. BOGOTA, D.C., _____

000001

PETITORIO



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

ón



No. 11-180116- -00000-0000

Fecha: 2011-12-28 15:28:15 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 266

FORMULARIO UNICO DE Solicitud
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

SOLICITUD DE:

①

☒ Patente de Invención.

☐ Patente de Modelo de Utilidad.

☒ Capítulo I

☐ Capítulo II

②

SOLICITANTE (71)

Nombre: 1. RIBOMIC INC.
2. OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD.

Dirección: 1. 16-13, Shirokanedai 3-chome,
Minato-ku, Tokyo 1080071 - JAPON
2. 9, Kanda-Tsukasamachi 2-chome,
Chiyoda-ku, Tokyo 1018535 - JAPON

Nacionalidad o Domicilio: 1. Tokyo - JAPON
2. Tokyo - JAPON

Lugar de Constitución: JAPON

Teléfono: Fax:
E-mail:

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual

Número

③

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: MARGARITA CASTELLANOS A.

Dirección: CALLE 94A No. 7A-09

Teléfono: 7560770 Fax: 7550158

E-mail: info@castellanosyco.com

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual

Número 39'779.654 TPA 70.819

④

INVENTOR (ES) (72)

VER ANEXO # 1

⑤

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/JP2010/059953

Fecha 11/06/2010

Publicación Internacional No. WO2010/143714 A1

Fecha 16/12/2010

⑥

Título (54)

APTAMERO PARA QUIMASA Y SU USO

⑦

Clasificación Internacional (51)

C12N 15/09, A61P 9/00, A61P 19/04, A61P 43/00, C12Q 1/68, A61K 31/7088

⑧

Prioridad

SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

JP

(32) Fecha

11/06/2009

(31) Número de Solicitud

2009-140585

⑨

Comprobantes de pago Nos.

11-120187 y 11-120191

Fecha

Diciembre 12 de 2011

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página.

10

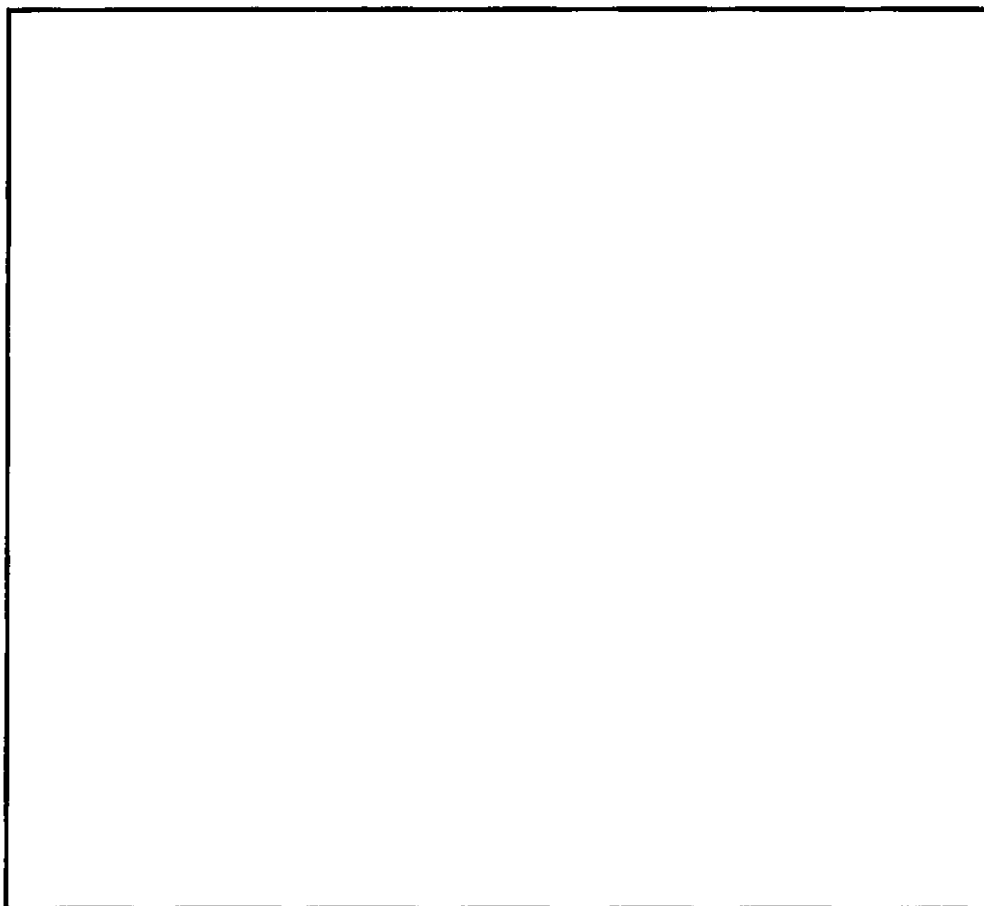
Anexos

000002

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
- ☒ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☒ Poderes, si fuere el caso, junto con la sustitución del mismo a mi favor
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones.
- ☒ Copia de la solicitud internacional (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).
- ☐ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).
- ☐ Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- ☐ Arte final 12x12
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- ☒ Otros Tarjeta Propietario y Extracto para la Publicación

11

FIGURA CARACTERISTICA:



12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO

FIRMA:

Margarita Castellanos
C.C. No. 39'779.654 Usaquén - TPA 70.819 C.S.J.

28 U.S. 2011

CASTELLANOS & CO LTDA
A B O G A D O S
Calle 94 A No. 7 A-09
Bogotá, D.C. - COLOMBIA

ANEXO # 1
INVENTORES

1. **YOSHIKAZU NAKAMURA**
c/o THE UNIVERSITY OF TOKYO
3-1, Hongo, 7-chome
Bunkyo-ku
Tokyo 1138654, JAPON
2. **LING JIN**
c/o RIBOMIC INC.
16-13, Shirokanedai 3-chome
Minato-ku
Tokyo 1080071, JAPON
3. **SATOKO YAMAZAKI**
c/o RIBOMIC INC.
16-13, Shirokanedai 3-chome
Minato-ku
Tokyo 1080071, JAPON
4. **HISAKO IKEDA**
c/o RIBOMIC INC.
16-13, Shirokanedai 3-chome
Minato-ku
Tokyo 1080071, JAPON
5. **MASAHIRO MURAGUCHI**
c/o OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD.
1-7-1, Doshomachi, Chuo-ku
Osaka-shi
Osaka 5410045, JAPON

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -

000004

RECIBO DE CAJA

No. 11 - 120187

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

Bogotá D.C., Diciembre 12 de 2011 - 14:51:01

RECIBIDO DE : CASTELLANOS Y Y CO

NI 800.174.641

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	420505536	12/12/2011	7.319.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNDITARIO	Vr. CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	571.000.00	571.000.00
				\$571.000.00

SON: **QUINIENTOS SETENTA Y UN MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-180116- -00000-0000

Fecha: 2011-12-28 15:28:15 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eje: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 266

Señe Contro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Canmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Diciembre 12 de 2011 - 14:51:04

Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 11 - 120191
		Bogotá D.C., Diciembre 12 de 2011 - 14:51:01

RECIBIDO DE : CASTELLANOS Y Y CO NI 800.174.641

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	420505536	12/12/2011	7.319.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNDITARIO	Vr. CONCEPTO
9	50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INICIALES	27.000.00	243.000.00
				\$243.000.00
=====				

SON: **DOSCIENTOS CUARENTA Y TRES MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-180116- -00000-0000

Fecha: 2011-12-28 15:28:15 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 266

PODER

El (los)
RIBOMIC INC.

Domiciliados en 16-13, Shirokanedai
3-chome, Minato-ku, Tokyo 108-0071, JAPON

Nombran por el presente a XIMENA CASTELLANOS A. y/o
MARGARITA CASTELLANOS A. abogadas con oficinas en la
Calle 94A No. 7A-09, Bogotá-Colombia para

y para obtener la protección de mi (nuestra) propiedad
Industrial y con este fin autorizamos a dichos apoderados para
que nos representen ante cualesquiera autoridades o personas
de los órdenes administrativo, contencioso -administrativo y
judicial en todo lo relacionado con los siguientes actos y
gestiones:

- Obtención de patentes de invención, modelos y dibujos
industriales; registro de marcas de fabrica, de servicio,
colectivas o defensivas y de denominaciones de origen,
depósito de nombres y enseñas comerciales; su
renovación, prórroga, inscripción de traspaso y cambio de
nombre o domicilio, cancelación voluntaria y el registro de
licencias de uso de esos derechos;
- Para la obtención de registros sanitarios;
- Acciones de oposición, observación, cancelación, nulidad,
medidas cautelares y en general los juicios civiles, penales,
administrativos o contencioso - administrativos que
promovamos o se nos promuevan.

Pudiendo en todos los actos y gestiones arriba mencionados
sustituir éste mandato, transigir, desistir, recibir, cancelar,
renunciar, aceptar notificaciones y nombrar apoderados
judiciales y extrajudiciales.

Finalmente, este poder ratifica la validez de todos los actos y
solicitudes que, a nombre de la poderdante hubieren realizado
los apoderados en relación con las facultades anteriormente
enumeradas, antes de la suscripción del presente poder

Dado y firmado hoy 25 DE Junio de 2009

en Tokyo, JAPON

por RIBOMIC INC.

(El notario debe suscribir el documento en la pagina siguiente)

(Se requiere legalización consular o mediante apostilla)

POWER OF ATTORNEY

I (we) the undersigned
RIBOMIC INC.

of 16-13, Shirokanedai 3-chome, Minato-ku,
Tokyo 108-0071 Japan

hereby grant(s) Power of Attorney to XIMENA
CASTELLANOS A. and/or MARGARITA CASTELLANOS a.
attorneys residing at Calle 94A No. 7A-09, Bogotá- Colombia,
to

and to obtain the protection of my (our) Industrial Property, for
which purpose we authorize the said attorneys to represent us
before any authorities, or persons, specially those,
administrative, contentious and judicial, in all matters
concerning the following:

- Obtainment of patents, models and designs, registration of
trademarks, service, collective and defensive marks, and of
designations of origin; the deposit of trade names and
ensigns; its renewal, extension, recordal of assignments,
change of name or domicile, voluntary cancellation, and the
registration of licenses of use of the above rights;
- For the obtainment of Sanitary registrations;
- Actions of opposition, cancellation, nullity, infringement,
granting of licenses; and in general the civil, criminal and
administrative suits related to those rights; actions and
suits instituted by us or against us;

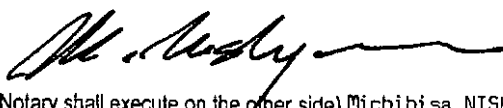
In all the above matters they may substitute this power of
attorney, compromise, desist, cancel, receive, renounce,
accept notifications and appoint attorneys in fact, in or out of
court.

Finally, this power of attorney ratifies the validity of all acts
and applications made by the representatives in the name of
the signatory of this power of attorney, with regard to the
faculties above given, before the execution of the present
power of attorney.

Given and signed this June 25, 2009

in Tokyo, Japan
RIBOMIC INC.

by


(Notary shall execute on the other side) Michihisa NISHIYAMA
CED

(Consular legalization or apostille is required)

CASTELLANOS & CO

ABOGADOS COLOMBIA

Calle 94A No. 7A-09- P.O.Box 6349 - Bogotá, Colombia
Tels.: (571) 610 74 20 / - Fax (571) 610 07 06 - e-mail info@castellanosyco.com

Como Notario Veintiseis del Circulo de
Bogotá, hago constar que esta copia
coincide con original que se ha presentado
Bogotá D.C., Colombia.

12 DIC 2011

GUSTAVO SAMPER RODRIGUEZ
NOTARIO VEINTISEIS



000007

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: **JAPAN**

This public document

2. has been signed by **Junji MIYASHITA**

3. acting in the capacity of **Notary Public of the Osaka
Legal Affairs Bureau**

4. bears the seal/stamp of **Junji MIYASHITA, Notary Public**

Certified

5. at **Osaka**

6. **JUN. 26. 2009**

7. by the **Ministry of Foreign Affairs**

8. No. **3483**

9. Seal/stamp:



10. Signature:

Noriko KAWAHITO

Noriko KAWAHITO

For the Minister for Foreign Affairs

Como Notario Veintiseis del Circuito de
Bogotá, hago constar que esta copia
coincide con el original que se ha presentado
Bogotá D.C. Colombia.

12 DIC 2011

GUSTAVO SAMPER RODRIGUEZ
NOTARIO VEINTISEIS

公証人

登簿番号平成21年第232号

嘱託人株式会社リボミックの代表取締役西山道久の代理人藤村綾子は、当公証人に対し、西山道久が添付書面の署名につき、自らしたものであることを承認している旨陳述した。

よって、これを認証する。

平成21年6月25日当公証人役場において。

大阪市中央区平野町2丁目1番2号（沢の鶴ビル内）

大阪法務局所属

公証人

宮下 準



Como Notario Veintiseis del Circulo de Bogota, hago constar que esta copia coincide con original que se ha presentado Bogota D.C. Colombia.

12 DIC 2011

GUSTAVO SAMPER RODRIGUEZ
NOTARIO VEINTISEIS

大阪法務局所属 公証人役場



000009

Registered No.

232 - 2009

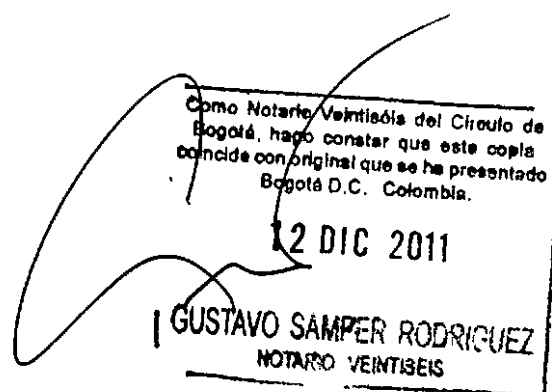
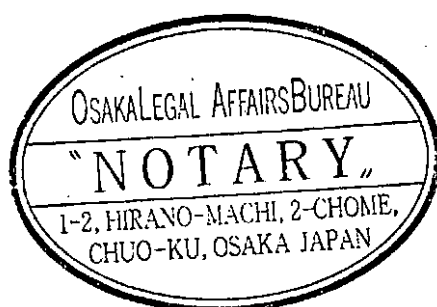
NOTARIAL CERTIFICATE

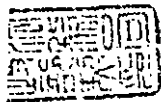
This is to certify that Ayako Fujimura, an agent of Mr. Michihisa NISHIYAMA, CEO of RIBOMIC INC., has stated in my presence that the said Mr. Michihisa NISHIYAMA acknowledged to have signed the attached document on this 25th day of June, 2009.

JUNJI MIYASHITA

NOTARY

Osaka Legal Affairs Bureau
1-2, Hirano-machi 2-chome
Chuo-ku, Osaka Japan





000010

総 第 2828 号

証 明

大阪法務局所属公証人

宮下 準二

平成 21年 6 月 25日 付

平成 21年 登簿 第 232 号

この認証の付与は、在職中の公証人が
その権限に基づいてしたものであり、
かつ、その押印は、真実のものであること
を証明する。

平成 21年 6 月 26日
平成 21年 6 月 26日

大阪法務局長 白石 研



CERTIFICATE

This is to certify that the annexed Notarial Certificate has
been executed by Notary, duly authorized and practising in Osaka,
Japan, and that the Official Seal appearing on the same is genuine.

Date JUN. 26. 2009

Director of the Osaka Legal Affairs Bureau

Como Notario, Verificador del Circulo de
Bogotá, hago constar que esta copia
coincide con original que se ha presentado
Bogotá D.C. Colombia.

12 DIC 2011

GUSTAVO SAMPER RODRIGUEZ
NOTARIO VEINTISEIS

-----TRADUCCION OFICIAL No. 090814-----

De un documento escrito en INGLES, el cual para su identificación lleva el sello y firma de la Traductora e Intérprete Oficial, Res. 2755/68 y 01144/97 del Ministerio de Justicia, hoy del Interior de Colombia.

(Anexos a un poder otorgado por RIBOMIC INC.)

REGISTRO No.232-2009

CERTIFICADO NOTARIAL

Se certifica por la presente que Ayako Fujimura, AGENTE DEL SEÑOR Michihisa NISHIYAMA, Director Ejecutivo de RIBOMIC INC. ha manifestado en mi presencia que dicho señor Michihisa NISHIYAMA reconoció haber firmado el documento adjunto el día 25 de Junio de 2009.

(fdo) ilegible

JUNJI MIYASHITA

NOTGARIO

Oficina de Asuntos Legales de Osaka

1-2, Hirano-machi, 2-chome

Chuo-ku, Osaka, Japón

(Sello) igual contenido.

Como Notario Veintiseis del Circulo de Bogotá, hago constar que esta copia coincide con original que se ha presentado Bogotá D.C. Colombia.

12 DIC 2011

GUSTAVO SAMPER RODRIGUEZ
NOTARIO VEINTISEIS

CERTIFICADO

Se certifica por la presente que el Certificado Notarial anexo ha sido otorgado por Notario debidamente autorizado y en ejercicio en Osaka, Japón, y que el sello oficial que aparece en el mismo es auténtico.

Fecha: Junio 26, 2009

000012

Director de La Oficina de Asuntos Legales de Osaka

APOSTILLA

(Convención de La Haya de Octubre 5, 1961)

1. País: JAPON

Este documento público

2. Ha sido firmado por: Junji MIYASHITA

3. Actuando en el carácter de Notario Público de la Oficina de Asuntos Legales de Osaka

4. Lleva el sello de: Junji MIYASHITA, Notario Público

CERTIFICADO

5. En Osaka

6. El 26 de Junio de 2009

1. Por el Ministerio de Relaciones Exteriores

2. No. 3483

3. Sello

10: Firma

(fdo. Ilegible)

Noriko KAWAHITO

Por el Ministerio de Relaciones Exteriores

(Sello)

ES TRADUCCION FIEL Y COMPLETA, a la cual me remito,

Bogotá, D. C., Agosto 24, 2009

MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES

2009 AGO 25 A 11:31

JEFE DE LEGALIZACIONES
BOGOTA D.C.

DORA DUQUE DE BERNAY

TRADUCTORA E INTERPRETE OFICIAL

RES. 02755/68 Y 01144/97 - MINJUSTICIA

REP. DE COLOMBIA

Como Notario Veintiséis del Circulo de Bogotá, hago constar que esta copia coincide con original que se ha presentado Bogotá D.C. Colombia.

12 DIC 2011

GUSTAVO SAMPER RODRIGUEZ
NOTARIO VEINTISEIS

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日

2010年12月16日(16.12.2010)



PCT

(10) 国際公開番号

WO 2010/143714 A1

(51) 国際特許分類:

C12N 15/09 (2006.01)

A61P 9/00 (2006.01)

A61P 19/04 (2006.01)

A61P 43/00 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

A61K 31/7088 (2006.01)

(21) 国際出願番号:

PCT/JP2010/059953

(22) 国際出願日:

2010年6月11日(11.06.2010)

(25) 国際出願の言語:

日本語

(26) 国際公開の言語:

日本語

(30) 優先権データ:

特願 2009-140585 2009年6月11日(11.06.2009) JP

(71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 株式会社リボミック(RIBOMIC INC.) [JP/JP]; 〒1080071 東京都港区白金台三丁目16番13号 Tokyo (JP). 大塚製薬株式会社(OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD.) [JP/JP]; 〒1018535 東京都千代田区神田司町2丁目9番地 Tokyo (JP).

(72) 発明者: および

(75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 中村 義一 (NAKAMURA, Yoshikazu) [JP/JP]; 〒1138654 東京都文京区本郷7丁目3番1号 国立大学法人東京大学内 Tokyo (JP). 金 玲(JIN, Ling) [CN/JP]; 〒1080071 東京都港区白金台三丁目16番13号 株式会社リボミック内 Tokyo (JP). 山▲崎 聡子(YAMAZAKI, Satoko) [JP/JP]; 〒1080071 東京都港区白金台三丁目16番13号 株式会社リボミック内 Tokyo (JP). 池田 寿子(IKEDA, Hisako) [JP/JP]; 〒1080071 東京都港区白金台三丁目16番13号 株式会社リボミック内 Tokyo (JP). 村口 正宏(MURAGUCHI, Masahiro)

[JP/JP]; 〒5410045 大阪府大阪市中央区道修町1-7-1 大塚製薬株式会社内 Osaka (JP).

(74) 代理人: 高島 一(TAKASHIMA, Hajime); 〒5410044 大阪府大阪市中央区伏見町四丁目1番1号 明治安田生命大阪御堂筋ビル Osaka (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーロアジア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ユーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告(条約第21条(3))
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト(規則5.2(a))

(54) Title: APTAMER FOR CHYMASE, AND USE THEREOF

(54) 発明の名称: キマーゼに対するアプタマー及びその使用

(57) Abstract: An aptamer which can bind to chymase to inhibit the activity of chymase and comprises the nucleotide sequence represented by the formula: $X_1GAUAGAN_1N_2UAAX_2$ (wherein X_1 and X_2 independently represent A or G; and N_1 and N_2 independently represent A, G, C, U or T); a complex comprising the aptamer and a functional substance (e.g., an affinity substance, a labeling substance, an enzyme, a drug delivery medium, or a medicinal agent); a medicinal agent or a reagent comprising the aptamer or the complex; a chymase detection method or a chymase purification method characterized by utilizing the aptamer or the complex; and others.

(57) 要約: キマーゼに結合しキマーゼの活性を阻害するアプタマー; $X_1GAUAGAN_1N_2UAAX_2$ (式中、 X_1 及び X_2 は、同一又は異なって、A又はGであり、 N_1 及び N_2 は、同一又は異なって、A、G、C、UまたはTである)で表されるヌクレオチド配列を含むアプタマー; 当該アプタマーおよび機能性物質(例えば、親和性物質、標識用物質、酵素、薬物送達媒体、又は薬物など)を含む複合体; 当該アプタマーあるいは複合体を含む医薬または試薬; 当該アプタマーあるいは複合体を用いることを特徴とするキマーゼの検出方法および精製方法などを提供する。

WO 2010/143714 A1

SPECIFICATION

APTAMER FOR CHYMASE, AND USE THEREOF

Technical Field

[0001]

5 The present invention relates to an aptamer against chymase, a method of utilizing the same and the like.

Background Of The Invention

[0002]

Human chymase (EC.3.4.21.39), a chymotrypsin-like serine
10 protease, is stored in mast cell secretory granules. Upon external stimulation, mast cells undergo degranulation, resulting in the release of human chymase, along with a wide variety of inflammation mediators, outside the cells. The released human chymase specifically recognizes aromatic amino
15 acids contained in substrate proteins and peptides, such as phenylalanine and tyrosine, and cleaves the peptide bonds adjoining to the amino acids. A representative substrate for human chymase is angiotensin I (AngI). Human chymase cleaves AngI to produce angiotensin II (AngII), a vasoconstricting
20 factor.

Mammalian chymases are phylogenetically classified under two subfamilies: α and β . Primates, including humans, express only one kind of chymase, which belongs to the α family. Meanwhile, rodents express both the α and β families of chymase.
25 In mice, there are a plurality of kinds of chymases, of which mouse mast cell protease-4 (mMCP-4), which belongs to the β family, is considered to be most closely related to human chymase, judging from its substrate specificity and mode of expression in tissue. In hamsters, hamster chymase-1, also a
30 member of the β family, corresponds to human chymase. Meanwhile, mMCP-5 and hamster chymase-2, which belong to the α family as with human chymase, possess elastase-like activity and differ from human chymase in terms of substrate specificity.

35 Chymase is profoundly associated with the activation of

transforming growth factor β (TGF- β). TGF- β exists in a latent form (latent-TGF- β) in extracellular matrices around epithelial cells and endothelial cells, and is retained in extracellular matrices via large latent TGF- β binding protein (LTBP). TGF- β is released from extracellular matrices as required and activated, and the activated TGF- β is a cytokine of paramount importance to living organisms reportedly involved in cell proliferation and differentiation and tissue repair and regeneration after tissue injury. Collapse of its signal leads to the onset and progression of a wide variety of diseases. It is thought that in this process, chymase is involved in the release of latent TGF- β from extracellular matrices and the conversion of latent TGF- β to active TGF- β .

Chymase is known to be associated with a broad range of diseases, including fibrosis, cardiovascular diseases, inflammation, allergic diseases and organ adhesion. Fibrosis is an illness characterized by abnormal metabolism of extracellular substrates in the lung, heart, liver, kidney, skin and the like, resulting in excess deposition of connective tissue proteins. In pulmonary fibrosis, for example, connective tissue proteins such as collagen deposit in excess in the lung, resulting in hard shrinkage of pulmonary alveoli and ensuing respiratory distress. Lung fibrosis has been shown to result from pneumoconiosis, which is caused by exposure to a large amount of dust, drug-induced pneumonia, which is caused by use of drugs such as anticancer agents, allergic pneumonia, pulmonary tuberculosis, autoimmune diseases such as collagen disease, and the like. However, there are not a few cases in which the cause is unknown.

The mechanism of onset of fibrosis at the molecular level has not been elucidated well. Generally, in normal states, the proliferation and functions of fibroblasts are well controlled. In case of serious or persistent inflammation or injury, however, the tissue repair mechanism works in excess, resulting in abnormal proliferation of fibroblasts and

overproduction of connective tissue proteins. TGF- β is known as a factor that causes these phenomena. As evidence suggestive of its involvement, it has been reported that administration of an anti-TGF- β neutralizing antibody to an
5 animal model of fibrosis causes decreased collagen expression and significantly suppressed fibrosis. In patients with idiopathic pulmonary fibrosis, increased levels of TGF- β and elevated counts of chymase-positive mast cells are observed.

Meanwhile, association of chymase in fibrosis has been
10 demonstrated by experiments using animal models. In a hamster model of bleomycin-induced pulmonary fibrosis, facilitated chymase activity, increased expression of collagen III mRNA, tissue fibrosis and other phenomena are significantly reduced by chymase inhibitors. The same effects have been observed for
15 a mouse model of bleomycin-induced pulmonary fibrosis; administration of chymase inhibitors suppressed chymase activity and reduced hydroxyproline content.

With these features, chymase inhibitors can be used as prophylactic or therapeutic drugs for diseases related to
20 chymase, such as fibrosis. Chymase inhibitors that have been developed include small molecular compounds such as TPC-806, SUN-13834, SUN-C8257, SUN-C8077, and JNJ-10311795 (Patent document 1).

[0003]

25 In recent years, applications of RNA aptamers to therapeutic drugs, diagnostic reagents, and test reagents have been drawing attention; some RNA aptamers have already been in clinical study stage or in practical use. In December 2004, the world's first RNA aptamer drug, Macugen, was approved as a
30 therapeutic drug for age-related macular degeneration in the US. An RNA aptamer refers to an RNA that binds specifically to a target molecule such as a protein, and can be prepared using the SELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment) method (Patent documents 2-4). In the SELEX method,
35 an RNA that binds specifically to a target molecule is

selected from an RNA pool with about 10^{14} different nucleotide sequences. The RNA used has a random sequence of about 40 nucleotides, which is flanked by primer sequences. This RNA pool is allowed to mixed with a target molecule, and only the
5 RNA that has bound to the target molecule is separated using a filter and the like. The RNA separated is amplified by RT-PCR, and this is used as a template for the next round. By repeating this operation about 10 times, an RNA aptamer that binds specifically to the target molecule can be acquired.

10 Aptamer drugs, like antibody drugs, can target extracellular proteins. With reference to many scientific papers and other reference materials in the public domain, aptamer drugs are judged to potentially surpass antibody drugs in some aspects. For example, aptamers often exhibit higher
15 affinity and specificity for target molecules than do antibodies. Aptamers are unlikely to undergo immune elimination, and adverse reactions characteristic of antibodies, such as antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) and complement-dependent cytotoxicity
20 (CDC), are reportedly unlikely to occur with the use of aptamers. From the viewpoint of drug delivery, aptamers are likely to migrate to tissues because of their molecular size of about one-tenth that of antibodies, enabling easier drug delivery to target sites. Because aptamers are produced by
25 chemical synthesis, they permit site-selective chemical modifications, and enable cost reduction by mass-production. Other advantages of aptamers include long-term storage stability, heat resistance and solvent resistance. Meanwhile, the blood half-lives of aptamers are generally shorter than
30 those of antibodies; however, this property is sometimes advantageous in view of toxicity. These facts lead to the conclusion that even when the same molecule is targeted, aptamer drugs potentially surpass antibody drugs.

[Prior Document]

35 [Patent Document]

[0004]

[Patent Document 1] USB6500835

[Patent Document 2] WO91/19813

[Patent Document 3] WO94/08050

5 [Patent Document 4] WO95/07364

[Summary of the Invention]

[Problems to be Solved by the Invention]

[0005]

The present invention is directed to providing an aptamer
10 for chymase and a method for utilizing the same, and the like.

[Means of Solving the Problems]

[0006]

The present inventors investigated diligently to solve
the problem described above and succeeded in preparing an
15 aptamer of good quality for chymase, which resulted in the
completion of the present invention.

[0007]

Accordingly, the present invention provides the
following:

20 [1] An aptamer that binds to chymase to inhibit a chymase
activity.

[2] The aptamer according to [1], comprising a nucleotide
sequence represented by $X_1GAUAGAN_1N_2UAAX_2$ (SEQ ID NO: 21; each
of X_1 and X_2 , whether identical or not, is A or G, and each of
25 N_1 and N_2 , whether identical or not, is A, G, C, U or T).

[3] The aptamer according to [2], wherein N_1N_2 is GA, GU, GC,
UU, GT or CU.

[4] The aptamer according to [2], wherein X_1 and X_2 are both A
or both G.

30 [5] The aptamer according to [3] or [4], wherein at least one
of the pyrimidine nucleotides has been modified or altered.

[6] The aptamer according to [1], comprising any one of the
nucleotide sequences (a), (b) and (c) below:

(a) an aptamer comprising a nucleotide sequence selected from
35 among SEQ ID NO: 4-34, 38-57, 59-65 and 69-72 (with the

provision that the uracil may be thymine);

(b) an aptamer comprising a nucleotide sequence selected from among SEQ ID NO: 4-34, 38-57, 59-65 and 69-72 (with the provision that the uracil may be thymine), wherein 1 to 5

5 nucleotides are substituted, deleted, inserted or added; and

(c) a nucleotide sequence having an identity of 70% or more to a nucleotide sequence selected from among SEQ ID NO: 4-34, 38-57, 59-65 and 69-72 (with the provision that the uracil may be thymine).

10 [7] The aptamer according to [6], wherein at least one of the nucleotides contained in the aptamer has been modified or altered.

[8] The aptamer according to [1], comprising any one of the nucleotide sequences (a'), (b') and (c') below:

15 (a') a nucleotide sequence selected from among SEQ ID NO:

56(1)-56(7), 56(9), 56(11), 56(12), 56(15)-56(52), 61(1), 69(1), 69(2), and 72(1)-72(8) (with the provision that the uracil may be thymine);

(b') a nucleotide sequence selected from among SEQ ID NO:

20 56(1)-56(7), 56(9), 56(11), 56(12), 56(15)-56(52), 61(1),

69(1), 69(2), and 72(1)-72(8) (with the provision that the uracil may be thymine), wherein 1 to 5 nucleotides are substituted, deleted, inserted or added; and

(c') a nucleotide sequence having an identity of 70% or more

25 to a nucleotide sequence selected from among SEQ ID NO: 56(1)-

56(7), 56(9), 56(11), 56(12), 56(15)-56(52), 61(1), 69(1),

69(2), and 72(1)-72(8) (with the provision that the uracil may be thymine).

[9] The aptamer according to [1], wherein each of the hydroxy
30 groups at the 2'-positions of respective pyrimidine nucleotides contained in the aptamer, whether identical or not, may be substituted by an atom or a group selected from the group consisting of a hydrogen atom, a fluorine atom and a methoxy group.

35 [10] The aptamer according to [1], wherein each of the hydroxy

groups at the 2'-positions of respective purine nucleotides contained in the aptamer, whether identical or not, may be substituted by an atom or a group selected from the group consisting of a hydrogen atom, a fluorine atom and a methoxy
5 group.

[11] A complex comprising any one of the aptamers [1] to [10] and a functional substance.

[12] The complex according to [11], wherein the functional substance is an affinity substance, a substance for labeling,
10 an enzyme, a drug delivery vehicle or a drug.

[13] A pharmaceutical comprising any one of the aptamers [1] to [10] or the complex [11] or [12].

[14] The pharmaceutical according to [13], which is used to prevent or treat a cardiovascular disease or fibrosis.

15 [15] A diagnostic reagent comprising any one of the aptamers [1] to [10] or the complex [11] or [12].

[16] A chymase detection probe comprising any one of the aptamers [1] to [10] or the complex [11] or [12].

[17] A solid phase carrier for chymase purification comprising
20 any one of the aptamers [1] to [10] or the complex [11] or [12].

[18] A method of detecting chymase, comprising using any one of the aptamers [1] to [10] or the complex [11] or [12].

[19] A method of purifying chymase, comprising using any one
25 of the aptamers [1] to [10] or the complex [11] or [12].

[Effect of the Invention]

[0008]

The aptamer or the complex of the present invention can be useful as a pharmaceutical or reagent such as a diagnostic
30 reagent for various diseases caused by chymase, such as fibrosis and cardiovascular diseases. The aptamer or the complex of the present invention can also be useful in purifying and concentrating chymase, and detecting and quantifying chymase.

35 [0009]

Fig. 1 shows the secondary structure of aptamer shown by SEQ ID NO: 4, 5, 12-14, 18 predicted by the MFOLD program, wherein the part enclosed in a circle shows a common sequence shown by SEQ ID NO: 21.

5 Fig. 2 shows the secondary structure of aptamer shown by SEQ ID NO: 22-27 predicted by the MFOLD program, wherein the part enclosed in a circle shows a common sequence shown by SEQ ID NO: 21.

Fig. 3 shows the secondary structure of aptamer shown by
10 SEQ ID NO: 28-34 predicted by the MFOLD program, wherein the part enclosed in a circle shows a common sequence shown by SEQ ID NO: 21.

Fig. 4 shows how the aptamers shown by SEQ ID NO: 12 and 13 bind to chymase, wherein 40N indicates an RNA pool
15 containing a random sequence of 40 nucleotides. As a capture molecule, each aptamer or the negative control 40N was immobilized; as an analyte, human chymase was injected. The measurements were taken using Biacore T100 (manufactured by GE Healthcare).

20 Fig. 5 shows the secondary structure of aptamer shown by SEQ ID NO: 38-40, 43, 48 predicted by the MFOLD program, wherein the part enclosed in a circle shows a common sequence shown by SEQ ID NO: 21.

Fig. 6 shows the secondary structure of aptamer shown by
25 SEQ ID NO: 49, 51, 55-57 predicted by the MFOLD program, wherein the part enclosed in a circle shows a common sequence shown by SEQ ID NO: 21.

Fig. 7 shows how the aptamers shown by SEQ ID NO: 13, 55, and 56 bind to chymase, wherein 40N indicates an RNA pool
30 containing a random sequence of 40 nucleotides. Chymase was immobilized onto a chip surface; as an analyte, each aptamer or the negative control 40N was injected. The measurements were taken using Biacore T100 (manufactured by GE Healthcare).

Fig. 8 shows the results of detection by Western blotting
35 of how LTBP-1 was degraded by chymase and how the LTBP-1

degradation was inhibited by the aptamers listed in Table 9. Lane numbers 1, 8, 9, 23, and 31 show the markers; lane numbers 6, 21, and 29 show the results for negative controls (no inhibitor); lane numbers 7, 22, and 30 show the results
5 for chymase-free controls.

[Best Mode for Carrying out the Invention]

[0010]

The present invention provides an aptamer possessing a binding activity for chymase. The aptamers of the present
10 invention are capable of inhibiting activities of chymase.

[0011]

An aptamer refers to a nucleic acid molecule having a binding affinity for a particular target molecule. The aptamer can also inhibit the activity of a particular target molecule
15 by binding to the particular target molecule. The aptamer of the present invention possesses binding activity for chymase, and is capable of inhibiting a chymase activity. The aptamer of the present invention can be an RNA, a DNA, a modified nucleic acid or a mixture thereof. The aptamer of the present
20 invention can also be in a linear or circular form.

[0012]

Chymase, a publicly known serine protease, is stored in mast cell secretory granules. Chymase is profoundly involved in a wide variety of biological reactions mediated by mast
25 cells, including, for example, bioactive peptide production and degradation, extracellular matrix remodeling, networks with cytokines, and immunity. The aptamer of the present invention can exhibit inhibitory activity against chymase derived from any mammals. Such mammals include primates (e.g.,
30 humans, monkeys), rodents (e.g., mice, rats, guinea pigs, hamsters), and companion animals, domesticated animals and work animals (e.g., dogs, cats, horses, bovines, goat, sheep, pigs), with preference given to humans. The amino acid sequence of human chymase is shown by Accession Number
35 AAB26828, and may be a sequence having one to several mutated

residues, a domain moiety thereof, or a peptide moiety thereof. The structure of human chymase may be not only a monomer, but also a dimer or polymer.

[0013]

5 The aptamer of the present invention binds to chymase in physiological buffer solutions. Although there is no limitation on the choice of buffer solution, preference is given to buffer solutions having a pH of about 5.0-10.0. Such buffer solutions include, for example, the solution A and
10 solution C described below (see Examples 1 and 2). The aptamer of the present invention binds to chymase at strength detectable by any one of the tests described below.

 Binding strength is measured using Biacore T100 (manufactured by GE Healthcare). In a method of measurement,
15 the aptamer is first immobilized onto a sensor chip, the amount immobilized being about 1000 RU. 20 μ L of a chymase solution for analyte, prepared at 0.2 μ M, is injected, and the binding of chymase to the aptamer is detected. An RNA comprising a random nucleotide sequence of 30 or 40
20 nucleotides is used as a negative control. If the chymase binds to the aptamer equivalently or significantly more potently compared with the control RNA, the aptamer is judged to have the capability of binding to chymase.

 In another method, chymase is first immobilized onto a
25 sensor chip, the amount immobilized being about 4000 RU. 20 μ L of an aptamer solution for analyte, prepared at 0.01 μ g/ μ L, is injected, and the binding of the aptamer to chymase is detected. An RNA containing a random nucleotide sequence of 30 or 40 nucleotides is used as a negative control. If the
30 chymase binds to the aptamer equivalently or significantly more potently compared with the control RNA, the aptamer is judged to have the capability of binding to chymase.

[0014]

 An inhibitory activity against chymase means an
35 inhibitory potential against any activities possessed by

chymase. For example, enzyme activity to hydrolyze and cleave peptide chains, which is one of the functions of chymase, is inhibited. Acceptable substrates for enzyme activity are not limited to proteins and bioactive peptides present in living organisms (e.g., AngI, latent TGF- β and the like), but include peptides, containing partial amino acid sequences of the foregoing peptides, conjugated with chromogenic substance or fluorescent substance. Chromogenic substances and fluorescent substances are known to those skilled in the art. Phenomena that occur via protein or bioactive peptide degradation reactions include increased expression of collagen I/III, increased hydroxyproline content, increased expression of IgE and the like; suppressive effects thereon are also included in the inhibitory activities against chymase. In addition, inhibitory activities against the migration of neutrophils, monocytes, and eosinophils to chymase is also included in inhibitory activity against chymase. Furthermore, suppressive effects against chymase-induced histamine release promotion, mast cell count elevation, increased vascular permeability, tissue fibrosis, inflammation, angiogenesis, vascular intimal thickening and the like are also included in the inhibitory activities against chymase.

[0015]

A substrate for chymase means a peptide, protein or the like that undergoes hydrolytic cleavage by chymase. Substrates for chymase known to exist in living organisms include peptides and proteins such as AngI, latent TGF- β , stem cell factor (SCF), procollagen, procollagenase, fibronectin, promatrix metalloprotease-1 (pro-MMP-1), pro-MMP-9, tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 (TIMP-1), apolipoprotein A-I (apoA-I), apoE, phospholipid transfer protein, IL-1 β precursor, big-endothelin-1 (big-ET-1), big-ET-2, connective tissue-activating peptide III, IL-18 precursor, substance P, vasoactive intestinal peptide (VIP), kallidin, bradykinin, and C3a. Herein, chymase substrates are not

limited to them, but include artificially designed model peptides comprising amino acid residues specifically recognized by chymase, such as Phe and Tyr, as well as these peptides conjugated with chromogenic substance or fluorescent substance.

[0016]

Whether an aptamer inhibits the enzyme activity of chymase can be determined by, for example, the three testing methods described below.

10 [0017]

A first method employs a synthetic substrate. A useful chymase substrate is Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-MCA (4-methylcoumaryl-7-amide group) (manufactured by Peptide Institute, Inc.), which contains the 4-amino acid peptide "Ala-Ala-Pro-Phe", a standard substrate for chymotrypsin-like proteases.

The assay is performed using a 96-well plate (F16 Black Maxisorp Fluoronunc, manufactured by Nunc), with a reaction mixture volume of 100 μ L, in a buffer solution (solution C; see 20 Example 2 below). First, each nucleic acid is prepared in solution C to obtain 50 μ L solutions. After 10 μ L of the 1 mM substrate prepared in solution C is added, the plate is set to the microplate reader SpectraMax190 (manufactured by Molecular Devices Corporation), and incubated at 37°C for 5 minutes. Separately, 0.05 μ g of chymase (recombinant, manufactured by 25 SIGMA) is diluted in solution C, and 40 μ L of this dilution is incubated at 37°C for 5 minutes. The chymase solution is added to the mixture of the nucleic acid and substrate to initiate an enzyme reaction. The plate containing the reaction mixture is set to the microplate reader SpectraMax190 (manufactured by 30 Molecular Devices Corporation), and examined for time-dependent changes in the fluorescence intensity at 37°C for 5 minutes (excitation wavelength 380 nm, detection wavelength 460 nm). A linear approximation of the increase in the 35 fluorescence of the AMC (7-amino-4-methylcoumarine) released

from the substrate by chymase activity is generated, and its slope is taken as the initial reaction velocity. For control, samples are treated and analyzed in the same manner in two cases: use of a nucleic acid pool containing a random sequence
5 of 30 or 40 nucleotides (negative control), and use of chymostatin, a known chymotrypsin-like serine protease inhibitor (positive control). Taking the initial reaction velocity without the nucleic acid and inhibitor as a 100% enzyme activity, the inhibitory rate for each test substance
10 is calculated, and the inhibitor concentration required to cause a 50% inhibition of the enzyme activity (IC_{50}) is determined. An aptamer exhibiting a lower IC_{50} value than that of chymostatin, a known inhibitor, is judged to possess excellent inhibitory activity.

15 [0018]

A second method of evaluation employs a native substrate. A useful native substrate for chymase is angiotensin I. Here, His-Leu, a peptide fragment released upon degradation of angiotensin I, is fluorescently derivatized, and the
20 fluorescence intensity therefrom is quantified.

In the assay, an enzyme reaction is carried out in 50 μ L of solution C. First, 0.3-0.75 ng of chymase (recombinant, manufactured by SIGMA; or native, manufactured by Calbiochem) is diluted in solution C to obtain 5 μ L chymase solution. Each
25 nucleic acid is prepared in solution C to obtain 25 μ L solutions. 5 μ L of each chymase dilution and 25 μ L of each nucleic acid solution are mixed, and then the mixture is incubated at 37°C for 5 minutes. Separately, 20 μ L of 125 μ M angiotensin I (manufactured by Peptide Institute, Inc.) is
30 prepared in solution C and incubated at 37°C for 5 minutes. The angiotensin I solution is added to the mixture of chymase and nucleic acid, and the enzyme reaction is initiated. After the reaction was allowed to proceed at 37°C for 90 minutes, 25 μ L of ice-cooled 30% trichloroacetic acid solution is added to
35 terminate the reaction. The entire mixture is centrifuged at

4°C, 14000 rpm for 10 minutes, and 30 µL of the resulting supernatant is used for the subsequent reaction for fluorescent derivatization.

After 30 µL of the supernatant is added to a 96-well plate (Black, manufactured by Costar), 15 µL of 2% o-phthalaldehyde (manufactured by SIGMA) solution in methanol and 170 µL of 0.3M NaOH solution are mixed in each well, and the plate is allowed to stand at room temperature for 10 minutes. Subsequently, 25 µL of 3M HCl solution is added to terminate the reaction. The plate is set to the microplate reader SpectraMax190 (manufactured by Molecular Devices Corporation), and the fluorescence intensity is determined at an excitation wavelength of 355 nm and a fluorescence wavelength of 460 nm.

For control, samples are treated and analyzed in the same manner in two cases: use of SEQ ID NO: 58 (negative control) and use of chymostatin, a known chymotrypsin-like serine protease inhibitor (positive control). In both cases, fluorescence intensity obtained at 0 minute reaction time serves as a blank determination. Taking the fluorescence intensity detected with the addition of an equal volume of solution C, in place of each nucleic acid, in the chymase enzyme reaction as 100%, the inhibitory rate for each test substance is calculated, and the inhibitor concentration required to cause a 50% inhibition of the enzyme activity (IC₅₀) is determined. An aptamer exhibiting a lower IC₅₀ value than that of chymostatin, a known inhibitor, is judged to possess excellent inhibitory activity.

[0019]

A third method of evaluation employs a native substrate contained in a cell culture supernatant. Here, degradation of chymase substrate LTBP-1 is detected by Western blotting. NHLF cells (manufactured by Cambrex Bio Science) under freezing are rapidly thawed in a 37°C water bath, and then suspended in a medium (10% FBS/F-12). After centrifugation at 1200 rpm for 5

minutes, the resulting supernatant is removed, and the cells are re-suspended in the medium. Total volume of 10 mL medium is added to the centrifuged cells, and the cell suspension is transferred to a cell culture dish and cultured at 37°C in the presence of 5% CO₂. The cells are observed morphology and proliferation status under a microscope. When the cells become confluent, the medium is replaced with a serum-free medium (0.2% BSA/F-12). Two days after replacement of the medium, the culture supernatant is collected, dispensed, and stored under freezing at -30°C.

After 40 µL of the NHLF culture supernatant, freshly thawed before use, is dispensed to a tube, 5 µL of the nucleic acid solution diluted with solution C is added thereof. For positive control, chymostatin is diluted with solution C, and this dilution is added in the same manner. For negative control, solution C alone is added. Next, 5 µL of a 100 ng/mL dilution of chymase in solution E (solution C+0.1% BSA, 0.05% sodium azide) is added. For control, a chymase-free tube is prepared. After stirring, the sample is incubated at 37°C for 1 hour, and mixed with an equal volume of lysis buffer for electrophoresis to terminate the reaction. LTBP-1 in the sample is detected by the procedure of Western blotting described below.

The sample mixed in the lysis buffer is boiled for 3 minutes, and 10 µL of the sample is subjected to electrophoresis on 5-20% acrylamide gel. After completion of the electrophoresis, the sample is transferred onto a nitrocellulose filter, after which the filter is blocked with 5% skimmed milk, 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), and 0.05% sodium azide. The filter is reacted with a 2 µg/mL dilution of anti-LTBP-1 monoclonal antibody in 2% BSA, PBS, and 0.05% sodium azide at room temperature overnight. The filter is washed 3 times and incubated with secondary antibody solution (HRP-labeled anti-mouse IgG antibody diluted 10000 fold with 0.1% BSA/PBS) at room temperature for 2 hours. The filter is washed

5 times, and detection is performed using a chemiluminescent substrate.

As determined according to LTBP-1 band density and position (molecular weight), the band from the chymase-free well serves for positive control (+), and the band from the negative control well serves for negative control (-). Each test substance is examined for inhibitory activity by visual inspection.

[0020]

10 There is no limitation on the aptamer of the present invention, as far as it is capable of binding to any portions of chymase to inhibit the activity thereof.

[0021]

The length of the aptamer of the present invention is not limited, and can usually be about 10 to about 200 nucleotides, and can be, for example, not more than about 100 nucleotides, preferably not more than about 50 nucleotides, more preferably not more than about 40 nucleotides, most preferably not more than about 30 nucleotides. When the total number of nucleotides is smaller, chemical synthesis and mass-production will be easier, and there is a major advantage in terms of cost. It is also thought that chemical modification is easy, stability in the body is high, and toxicity is low.

[0022]

25 Each of the nucleotides contained in the aptamer of the present invention, whether identical or different, can be a nucleotide comprising a hydroxyl group at the 2' position of ribose (e.g., ribose of pyrimidine nucleotide, ribose of purine nucleotide) (i.e., an unsubstituted nucleotide) or a nucleotide substituted by any atom or group at the 2' position of ribose. As examples of such any atom or group, a nucleotide substituted by a hydrogen atom, a fluorine atom or an -O-alkyl group (e.g., -O-Me group), an -O-acyl group (e.g., -O-COMe group), or an amino group (e.g., -NH₂ group) can be mentioned.

35 [0023]

The aptamer of the present invention has a sequence represented by $X_1GAUAGAN_1N_2UAAX_2$ (SEQ ID NO: 21; wherein each of X_1 and X_2 , whether identical or not, is A or G, and each of N_1 and N_2 , whether identical or not, is A, G, C, U or T; with the provision that the uracil may be thymine). An aptamer having this sequence strongly binds to chymase to inhibit a chymase activity.

[0024]

In the formula above, X_1 and X_2 are preferably both A or both G; N_1N_2 is preferably GA, GU, GC, UU, GT or CU (with the provision that the uracil may be thymine).

[0025]

The aptamer of the present invention can also be the nucleotide wherein at least one kind (e.g., 1, 2, 3 or 4 kinds) of nucleotide comprises a hydroxyl group, or the above-described any atom or group, for example, at least two kinds (e.g., 2, 3 or 4 kinds) of groups selected from the group consisting of a hydrogen atom, a fluorine atom, a hydroxyl group and a methoxy group, at the 2' position of ribose.

[0026]

In the aptamer of the present invention, all pyrimidine nucleotides can be nucleotides substituted by a fluorine atom, or nucleotides substituted by any atom or group mentioned above, preferably an atom or group selected from the atom or group consisting of a hydrogen atom, a hydroxyl group and a methoxy group whether identical or not, at the 2' position of ribose.

[0027]

In the aptamers of the present invention, all purine nucleotides can be nucleotides comprising a hydroxyl group, or nucleotide substituted by any atom or group mentioned above, preferably an atom or a group selected from the group consisting of a hydrogen atom, a methoxy group, and a fluorine atom, whether identical or not, at the 2'-position of ribose.

[0028]

The aptamer of the present invention can also be one wherein all nucleotides identically comprise a hydroxyl group, or any atom or group mentioned above, for example, the identical group selected by the group consisting of a hydrogen
5 atom, a fluorine atom, a hydroxyl group and a methoxy group, at the 2' position of ribose.

[0029]

Herein, in this specification, the nucleotides constituting the aptamer are assumed to be RNAs (i.e., the
10 sugar groups are assumed to be ribose) in describing how the sugar groups are modified in the nucleotides. However, this does not mean that DNA is exempted from the aptamer-constituting nucleotides, and a modification of RNA should read as a modification of DNA as appropriate. When the
15 nucleotide constituting the aptamer is DNA, for example, substitution of the hydroxyl group at the 2' position of ribose by X should read as a substitution of one hydrogen atom at the 2' position of deoxyribose by X.

[0030]

20 The aptamer of the present invention can also be:

- (a) an aptamer comprising a nucleotide sequence selected from among SEQ ID NO:4-34, 38-57, 59-65 and 69-72 (with the provision that the uracil may be thymine);
- (b) an aptamer comprising a nucleotide sequence selected from
25 among SEQ ID NO:4-34, 38-57, 59-65 and 69-72 (with the provision that the uracil may be thymine), wherein 1 to 5 nucleotides are substituted, deleted, inserted or added; or
- (c) an aptamer comprising a nucleotide sequence having an identity of 70% or more (preferably 80% or more, more
30 preferably 90% or more, most preferably 95% or more) to a nucleotide sequence selected from among SEQ ID NO: 4-34, 38-57, 59-65 and 69-72 (with the provision that the uracil may be thymine). The aptamer of the present invention also includes:
- (d) a conjugate selected from the group consisting of a
35 conjugate of a plurality of aptamers (a) above, a conjugate of

a plurality of aptamers (b) above, a conjugate of a plurality of aptamers (c) above, and a conjugate of a plurality of aptamers (a), (b) and (c) above.

[0031]

- 5 Not only the aptamer (a) above, but also the aptamers (b) to (d) are capable of binding to chymase and/or inhibiting a chymase activity (chymase enzyme activity and the like).

[0032]

The aptamer of the present invention can also be:

- 10 (a') an aptamer comprising a nucleotide sequence selected from among SEQ ID NO: 56(1)-56(7), 56(9), 56(11), 56(12), 56(15)-56(52), 61(1), 69(1), 69(2) and 72(1)-72(8) (with the provision that the uracil may be thymine);

- (b') an aptamer comprising a nucleotide sequence selected from
15 among SEQ ID NO: 56(1)-56(7), 56(9), 56(11), 56(12), 56(15)-56(52), 61(1), 69(1), 69(2) and 72(1)-72(8) (with the provision that the uracil may be thymine), wherein 1 to 5 nucleotides are substituted, deleted, inserted or added; or

- (c') an aptamer comprising a nucleotide sequence having an
20 identity of 70% or more to a nucleotide sequence selected from among SEQ ID NO: 56(1)-56(7), 56(9), 56(11), 56(12), 56(15)-56(52), 61(1), 69(1), 69(2) and 72(1)-72(8) (with the provision that the uracil may be thymine). The aptamer of the present invention also includes:

- 25 (d') a conjugate selected from the group consisting of a conjugate of a plurality of aptamers (a') above, a conjugate of a plurality of aptamers (b') above, a conjugate of a plurality of aptamers (c') above, and a conjugate of a plurality of aptamers (a'), (b') and (c') above. Furthermore,
30 the aptamer of the present invention also includes:

- (e) a conjugate consisting of one or more aptamers selected from the group consisting of (a), (b) and (c) above, and one or more aptamers selected from the group consisting of (a'), (b') and (c').

35 [0033]

The aptamers (a')-(d') and (e) above are also capable of binding to chymase and/or inhibiting a chymase activity (chymase enzyme activity and the like).

[0034]

5 In (b) and (b') above, there is no limitation on the number of nucleotides substituted, deleted, inserted or added, as far as the aptamer is capable of binding to chymase and/or inhibiting a chymase activity (chymase enzyme activity and the like). The number of nucleotides can be, for example, not more
10 than about 30, preferably not more than about 20, more preferably not more than about 10, still more preferably not more than 5, most preferably 4, 3, 2 or 1.

[0035]

With respect to (c) and (c') above, "an identity" means a
15 ratio (%) of identical nucleotide residues to all overlapping nucleotide residues in the optimal alignment where two nucleotide sequences are aligned using a mathematical algorithm known in the technical field (preferably, the algorithm considers introduction of gaps on one or both of the
20 sequences for the best alignment).

[0036]

Nucleotide sequence identity in the present description can be calculated by, for example, aligning the two nucleotide sequences using the homology calculation algorithm NCBI BLAST-
25 2 (National Center for Biotechnology Information Basic Local Alignment Search Tool) under the following conditions (gap open=5 penalties; gap extension=2 penalties; x_dropoff=50; expectancy=10; filtering=ON).

[0037]

30 In (d), (d') and (e) above, conjugation can be achieved by tandem binding. In the conjugation, a linker may be utilized. As the linker, nucleotide chains (e.g., 1 to about 20 nucleotides) and non-nucleotide chains (e.g., -(CH₂)_n- linker, -(CH₂CH₂O)_n- linker, hexaethylene glycol linker, TEG
35 linker, peptide-containing linker, -S-S- bond-containing

linker, -CONH- bond-containing linker, -OPO₃- bond-containing linker) can be mentioned. The plurality as mentioned in the above-described plurality of conjugates is not particularly limited, as long as it is two or more, and the plurality can be, for example, 2, 3 or 4. Each of the nucleotides in (a) to (d), (a') to (d') and (e) above, whether identical or different, can be a nucleotide comprising a hydroxyl group at the 2' position of ribose or a nucleotide substituted by any groups (e.g., hydrogen atom, fluorine atom or -O-Me group) at the 2' position of ribose (e.g., ribose of pyrimidine nucleotide).

[0038]

The aptamer of the present invention may be one wherein a sugar residue (e.g., ribose) of each nucleotide has been modified to increase the chymase binding activity, stability, drug deliverability and the like. As examples of the site to be modified in a sugar residue, one having the oxygen atom at the 2'-position, 3'-position and/or 4'-position of the sugar residue replaced with another atom, and the like can be mentioned. As examples of the modification, fluorination, O-alkylation (e.g., O-methylation, O-ethylation), O-arylation, S-alkylation (e.g., S-methylation, S-ethylation), S-arylation, and amination (e.g., -NH₂) can be mentioned. Such alterations in the sugar residue can be performed by a method known per se (see, for example, Sproat et al., (1991) Nucle. Acid. Res. 19, 733-738; Cotton et al., (1991) Nucl. Acid. Res. 19, 2629-2635; Hobbs et al., (1973) Biochemistry 12, 5138-5145).

[0039]

The aptamer of the present invention may also have a nucleic acid base (e.g., purine or pyrimidine) altered (e.g., chemical substitution) to increase the chymase binding activity and the like. As examples of such alterations, 5-position pyrimidine alteration, 6- and/or 8-position purine alteration, alteration with an extracyclic amine, substitution with 4-thiouridine, and substitution with 5-bromo or 5-iodo-

uracil can be mentioned.

The phosphate group contained in the aptamer of the present invention may be altered to confer resistance to nuclease and hydrolysis. For example, the P(O)O group may be substituted with P(O)S (thioate), P(S)S (dithioate), P(O)NR₂ (amidate), P(O)CH₃, P(O)BH₃, P(O)R, R(O)OR', CO or CH₂ (formacetal) or 3'-amine (-NH-CH₂-CH₂-) [wherein each unit of R or R' is independently H or a substituted or unsubstituted alkyl (e.g., methyl, ethyl)].

10 The joining group is, for example, -O-, -N- or -S-, and nucleotides can bind to an adjoining nucleotide via these joining groups.

The alterations may also include alterations such as capping at 3' and 5'.

15 [0040]

An alteration can further be performed by adding to an end a polyethyleneglycol, amino acid, peptide, inverted dT, nucleic acid, nucleosides, Myristoyl, Lithocolic-oleyl, Docosanyl, Lauroyl, Stearoyl, Palmitoyl, Oleoyl, Linoleoyl, other lipids, steroids, cholesterol, caffeine, vitamins, pigments, fluorescent substances, anticancer agent, toxin, enzymes, radioactive substance, biotin and the like. For such alterations, see, for example, US Patents 5,660,985 and 5,756,703.

25 [0041]

The aptamer of the present invention can be synthesized as disclosed herein and by a method known per se in the art. A method of synthesis employs RNA polymerase. A DNA having a desired sequence and a promoter sequence of RNA polymerase is chemically synthesized, which, as a template, is transcribed by a publicly known method to obtain the desired RNA. The aptamer of the present invention can also be synthesized using DNA polymerase. A DNA having a desired sequence is chemically synthesized, which, as a template, is amplified by a method of public knowledge known as the polymerase chain reaction (PCR).

This is rendered single-stranded by a publicly known method of polyacrylamide electrophoresis or enzyme treatment. When synthesizing a modified aptamer, elongation reaction efficiency can be increased by using a polymerase mutated at a particular site. The aptamer thus obtained can easily be purified by a publicly known method.

An aptamer can be synthesized in large amounts by chemical synthetic methods such as the amidite method and the phosphoramidite method. These synthetic methods are well known, as described in Nucleic Acid (Vol.2) [1] Synthesis and Analysis of Nucleic Acid (edited by Yukio Sugiura, published by Hirokawa Publishing Company) and the like. Practically, a synthesizer such as OligoPilot100 or OligoProcess (manufactured by GE Healthcare Bioscience) is used. The aptamer thus synthesized can be purified by a method known per se such as chromatography.

Provided that an active group such as an amino group is introduced to an aptamer during the process of chemical synthesis by the phosphoramidite method or the like, a functional substance can be added after the synthesis. For example, by introducing an amino group to an end of the aptamer, it is possible to condense a polyethylene glycol chain incorporating a carboxyl group.

An aptamer binds to the target molecule in a wide variety of binding modes, such as ionic bonds based on the negative charge of the phosphate group, hydrophobic bonds and hydrogen bonds based on ribose, and hydrogen bonds and stacking interaction based on nucleic acid bases. In particular, ionic bonds based on the negative charge of the phosphate group, which are present in the same number as the number of constituent nucleotides, are strong, and bind to lysine and arginine being present on the surface of the positive charge of protein. For this reason, nucleic acid bases not involved in the direct binding to the target molecule can be substituted. In particular, because the region of stem

structure has already formed base pairs and faces the inside of the double helical structure, nucleic acid bases are unlikely to bind directly to the target molecule. Therefore, even when a base pair is replaced with another base pair, the activity of the aptamer often does not decrease. In structures wherein no base pairs are formed, such as loop structures, provided that the nucleic acid base is not involved in the direct binding to the target molecule, base substitution is possible. Regarding modifications of the 2'-position of ribose, the functional group at the 2'-position of ribose infrequently interacts directly with the target molecule, but in many cases, it is of no relevance, and can be substituted by another modified molecule. Hence, an aptamer, unless the functional group involved in the direct binding to the target molecule is substituted or deleted, often retains the activity thereof. It is also important that the overall three-dimensional structure does not change widely.

[0042]

An aptamer can be prepared by utilizing the SELEX method or an improved version thereof (for example, Ellington et al., (1990) Nature, 346, 818-822; Tuerk et al., (1990) Science, 249, 505-510). In the SELEX method, by rendering the selection criteria more rigorous by increasing the number of rounds or using a competing substance, an aptamer exhibiting a stronger binding potential for the target molecule is concentrated and selected. Hence, by adjusting the number of rounds of SELEX and/or changing the competitive condition, aptamers with different binding forces, aptamers with different binding modes, and aptamers with the same binding force or binding mode but different base sequences can be obtained in some cases. The SELEX method comprises a process of amplification by PCR; by causing a mutation by using manganese ions and the like in the process, it is possible to perform SELEX with higher diversity.

[0043]

The aptamers obtained by SELEX are nucleic acids that exhibit high affinity for the target molecule, but this does not mean inhibiting a bioactivity of the target molecule.

Chymase is a basic protein to which nucleic acids are thought to be likely to bind non-specifically, but aptamers other than those that bind strongly to a particular site of chymase do not influence the activity of the target molecule. In fact, the RNA comprising a random sequence used as a negative control did not inhibit the enzyme activity of chymase, although it bound to chymase weakly.

[0044]

Based on an active aptamer thus selected, SELEX can be performed to acquire an aptamer possessing higher activity. Specifically, after preparing a template wherein an aptamer with a determined sequence is partially randomized or a template doped with about 10 to 30% of random sequences, SELEX is performed again.

[0045]

An aptamer obtained by SELEX has a length of about 80 nucleotides, and this is difficult to prepare as a pharmaceutical as it is. Hence, it is necessary to repeat try-and-error efforts to shorten the aptamer to a length of about 50 nucleotides or less enabling easy chemical synthesis. Depending on the primer design for an aptamer obtained by SELEX, the ease of the subsequent minimization operation changes. Unless the primer is designed successfully, subsequent development will be impossible even if an aptamer with activity is selected by SELEX. In the present invention, an aptamer retaining activity even with 23 nucleotides was obtained.

[0046]

Aptamers are easily modifiable because they permit chemical synthesis. For aptamers, by predicting the secondary structure using the MFOLD program, or by predicting the steric structure by X-ray analysis or NMR analysis, it is possible to

predict to some extent which nucleotide can be substituted or deleted, and where to insert a new nucleotide. A predicted aptamer with the new sequence can easily be chemically synthesized, and it can be determined whether or not the
 5 aptamer retains the activity using an existing assay system.
 [0047]

If a region important to the binding of the aptamer obtained with the target molecule is identified by repeated try-and-error efforts as described above, the activity remains
 10 unchanged in many cases even when a new sequence is added to both ends of the sequence. The length of the new sequence is not particularly limited.
 [0048]

Those of ordinary skill in the art can make a wide range
 15 of design or alterations of modifications, like sequences.
 [0049]

As stated above, aptamers permit a wide range of design or alterations of modifications. The present invention also provides a production method of aptamer that enables a wide
 20 range of design or alteration of an aptamer comprising a specified sequence (e.g., a sequence corresponding to a portion selected from among stem regions, internal loop regions, bulge regions, hairpin loop regions and single-strand regions: hereinafter, abbreviated as fixed sequence as
 25 required).
 [0050]

For example, the production method of such aptamer includes production of an aptamer comprising a fixed sequence by using a single kind of nucleic acid molecule or a plurality
 30 of kinds of nucleic acid molecules (e.g., a library of nucleic acid molecules with different numbers for "a" or "b") consisting of a nucleotide sequence shown by the formula:
 [0051]

Primer sequence (i) -(N)a-fixed sequence-(N)b- Primer sequence
 35 (ii)

[0052]

[wherein (N)a represents a nucleotide chain consisting of "a" units of N; (N)b represents a nucleotide chain consisting of "b" units of N; each of the units of N, whether identical or
5 different, is a nucleotide selected from the group consisting of A, G, C, U and T (preferably, A, G, C and U). Each of "a" and "b", whether identical or different, can be any numbers, and can be, for example, 1 to about 100, preferably 1 to about 50, more preferably 1 to about 30, still more preferably 1 to
10 about 20 or 1 to about 10], and primer pairs corresponding to the primer sequences (i) and (ii), respectively.

[0053]

The present invention also provides a complex comprising the aptamer of the present invention and a functional
15 substance bound thereto. The bond between the aptamer and the functional substance in the complex of the present invention can be a covalent bond or a non-covalent bond. The complex of the present invention can be one wherein the aptamer of the present invention and one or more (e.g., 2 or 3) of functional
20 substances of the same kind or different kinds are bound together. The functional substance is not particularly limited, as far as it newly confers a certain function to an aptamer of the present invention, or is capable of changing (e.g., improving) a certain characteristic which an aptamer of the
25 present invention can possess. As examples of the functional substance, proteins, peptides, amino acids, lipids, sugars, monosaccharides, polynucleotides, and nucleotides can be mentioned. As examples of the functional substance, affinity substances (e.g., biotin, streptavidin, polynucleotides
30 possessing affinity for target complementary sequence, antibodies, glutathione Sepharose, histidine), substances for labeling (e.g., fluorescent substances, luminescent substances, radioisotopes), enzymes (e.g., horseradish peroxidase, alkaline phosphatase), drug delivery vehicles (e.g., liposome,
35 microspheres, peptides, polyethyleneglycols), drugs (e.g.,

those used in missile therapy such as calicheamycin and
duocarmycin; nitrogen mustard analogues such as
cyclophosphamide, melphalan, ifosfamide or trofosfamide;
ethylenimines such as thiotepa; nitrosoureas such as
5 carmustine; alkylating agents such as temozolomide or
dacarbazine; folate-like metabolic antagonists such as
methotrexate or raltitrexed; purine analogues such as
thioguanine, cladribine or fludarabine; pyrimidine analogues
such as fluorouracil, tegafur or gemcitabine; vinca alkaloids
10 such as vinblastine, vincristine or vinorelbine and analogues
thereof; podophyllotoxin derivatives such as etoposide, taxans,
docetaxel or paclitaxel; anthracyclines such as doxorubicin,
epirubicin, idarubicin and mitoxantrone, and analogues
thereof; other cytotoxic antibiotics such as bleomycin and
15 mitomycin; platinum compounds such as cisplatin, carboplatin
and oxaliplatin; pentostatin, miltefosine, estramustine,
topotecan, irinotecan and bicalutamide), and toxins (e.g.,
ricin toxin, liatoxin and Vero toxin) can be mentioned. These
functional molecules are finally removed in some cases.
20 Furthermore, the molecules may be peptides that can be
recognized and cleaved by enzymes such as thrombin, matrix
metalloproteinase (MMP), and Factor X, and may be
polynucleotides that can be cleaved by nucleases or
restriction endonuclease.

25 [0054]

The aptamer or the complex of the present invention can
be used as, for example, a pharmaceutical or a diagnostic
reagent, a test reagent or a reagents.

[0055]

30 The aptamer and complex of the present invention can
possess an activity to inhibit a function of chymase. As
stated above, chymase is profoundly associated with fibrosis
and cardiovascular diseases. Therefore, the aptamer and
complex of the present invention are useful as pharmaceuticals
35 for treating or preventing diseases accompanied by fibrosis or

cardiovascular disorders.

[0056]

The aptamer and complex of the present invention are capable of binding specifically to chymase. Therefore, the
5 aptamer and complex of the present invention are useful as probes for chymase detection. The probes are useful in in vivo imaging of chymase, measurements of blood concentrations of chymase, tissue staining, ELISA and the like. The probes are also useful as diagnostic reagents, testing reagents,
10 analytical reagents and the like for diseases involved by chymase (diseases accompanied by fibrosis or cardiovascular disorders, and the like).

[0057]

Based on their specific binding to chymase, the aptamer
15 and complex of the present invention can be used as ligands for purification of chymase.

[0058]

The aptamer and complex of the present invention can be used as drug delivery vehicles.

20 [0059]

Diseases involved by organ or tissue fibrosis include pulmonary fibrosis, prostatic hyperplasia, myocardial fibrosis, musculoskeletal fibrosis, myelofibrosis, hysteryoma, scleroderma, adhesion after surgical operations, postoperative
25 scars, burn scars, hypertrophic scars, keloid, atopic dermatitis, peritoneal sclerosis, asthma, liver cirrhosis, chronic pancreatitis, scirrhous gastric cancer, liver fibrosis, renal fibrosis, fibrous vascular diseases, retinitis due to fibrous microvasculitis as a diabetic complication, neurosis,
30 nephropathies, glomerulonephritis, tubulointerstitial nephritis, hereditary renal diseases, arteriosclerotic peripheral arteritis and the like.

[0060]

Cardiovascular diseases include angiopathies, aortic
35 aneurysms, renal insufficiency, hypertension, arteriosclerosis,

myocardial infarction, cardiac hypertrophy, heart failure, restenosis after angiopathies due to percutaneous transluminal coronary angioplasty and the like, diabetic and non-diabetic nephropathies, peripheral circulatory disorders and the like.

5 [0061]

Chymase possesses enzyme activity and cleaves bioactive substances that can serve as substrates. Examples of substrates known to date include AngI, latent TGF- β , SCF, procollagen, procollagenase, pro-MMP-9, IL-1 β precursor and the
10 like. Chymase exhibits biological actions, via reactions for production or degradation of these bioactive peptides, including extracellular matrix remodeling, networks with cytokines, immunity, and vasoconstriction. Meanwhile, chymase itself acts to activate mast cells and to promote histamine
15 release, and is closely associated with inflammation.

Therefore, the aptamer and complex of the present invention are not limited to the above-described substrates, and can be used as pharmaceuticals or diagnostic reagents, testing reagents, and analytical reagents for diseases related to
20 biological functions mediated by substrates accepted by chymase and diseases involved by chymase itself.

[0062]

The pharmaceutical of the present invention can be one formulated with a pharmaceutically acceptable carrier. As
25 examples of the pharmaceutically acceptable carrier, excipients such as sucrose, starch, mannitol, sorbitol, lactose, glucose, cellulose, talc, calcium phosphate, and calcium carbonate; binders such as cellulose, methylcellulose, hydroxylpropylcellulose, polypropylpyrrolidone, gelatin, gum
30 arabic, polyethylene glycol, sucrose, and starch; disintegrants such as starch, carboxymethylcellulose, hydroxylpropylstarch, sodium-glycol-starch, sodium hydrogen carbonate, calcium phosphate, and calcium citrate; lubricants such as magnesium stearate, Aerosil, talc, and sodium lauryl
35 sulfate; flavoring agents such as citric acid, menthol,

glycyrrhizin-ammonium salt, glycine, and orange powder; preservatives such as sodium benzoate, sodium hydrogen sulfite, methylparaben, and propylparaben; stabilizers such as citric acid, sodium citrate, and acetic acid; suspending agents such
5 as methylcellulose, polyvinylpyrrolidone, and aluminum stearate; dispersing agents such as surfactants; diluents such as water, physiological saline, and orange juice; base waxes such as cacao butter, polyethylene glycol, and kerosene; and the like can be mentioned, but these are not limitative.

10 [0063]

There is no limitation on the route of administration of the pharmaceutical of the present invention, which can be administered by, for example, oral administration and parenteral administration.

15 Preparations suitable for oral administration are a solution prepared by dissolving an effective amount of ligand in a diluent such as water, physiological saline, or orange juice; capsules, sachets or tablets comprising an effective amount of ligand in solid or granular form; a suspension
20 prepared by suspending an effective amount of active ingredient in an appropriate dispersant; an emulsion prepared by dispersing and emulsifying a solution of an effective amount of active ingredient in an appropriate dispersant; C10, which promotes the absorption of water-soluble substances, and
25 the like.

[0064]

The pharmaceutical of the present invention can be coated by a method known per se for the purpose of taste masking, enteric dissolution, sustained release and the like as
30 required. As examples of coating agents used for the coating, hydroxypropylmethylcellulose, ethylcellulose, hydroxymethylcellulose, hydroxypropylcellulose, polyoxyethylene glycol, Tween 80, Pluronic F68, cellulose acetate phthalate, hydroxypropylmethylcellulose phthalate,
35 hydroxymethylcellulose acetate succinate, Eudragit

(manufactured by Rohm, Germany, methacrylic acid/acrylic acid copolymer), pigments (e.g., red iron oxide, titanium dioxide and the like) and the like are used. The pharmaceutical may be a rapid-release preparation or sustained-release preparation.

5 [0065]

As preparations suitable for parenteral administration (for example, intravenous administration, subcutaneous administration, intramuscular administration, topical administration, intraperitoneal administration, intranasal
10 administration and the like), aqueous and non-aqueous isotonic sterile injectable liquids are available, which may comprise an antioxidant, a buffer solution, a bacteriostatic agent, an isotonizing agent and the like. Aqueous and non-aqueous sterile suspensions can also be mentioned, which may comprise
15 a suspending agent, a solubilizer, a thickener, a stabilizer, an antiseptic and the like. The preparation can be included in a container such as an ampoule or a vial in a unit dosage volume or in several divided doses. An active ingredient and a pharmaceutically acceptable carrier can also be freeze-dried
20 and stored in a state that may be dissolved or suspended in an appropriate sterile vehicle just before use.

[0066]

Sustained-release preparations are also suitable preparations. Dosage forms of sustained-release preparations
25 include sustained release from carriers or containers embedded in the body, such as artificial bones, biodegradable bases or non-biodegradable sponges, bags and the like. Devices for continuous or intermittent, systemic or topical delivery from outside the body, such as drug pumps and osmotic pressure
30 pumps, are also included in the scope of sustained-release preparations. Biodegradable bases include liposome, cationic liposome, Poly(lactic-co-glycolic) acid (PLGA), atherocollagen, gelatin, hydroxyapatite, polysaccharide sizofiran.

In addition to liquid injections, suspensions and
35 sustained-release preparations, inhalants suitable for

transpulmonary administration, ointments suitable for percutaneous administration, and the like are acceptable.

In the case of an inhalant, an active ingredient in a freeze-dried state is micronized and administered by inhalation using an appropriate inhalation device. An inhalant can be formulated as appropriate with a conventionally used surfactant, oil, seasoning, cyclodextrin or derivative thereof and the like as required. An inhalant can be produced according to a conventional method. Specifically, an inhalant can be produced by powdering or liquefying the aptamer or complex of the present invention, blending it in an inhalation propellant and/or carrier, and filling it in an appropriate inhalation vessel. When the above-described aptamer or complex of the present invention is a powder, an ordinary mechanical powder inhalator can be used; in the case of a liquid, an inhalator such as a nebulizer can be used. Here, as the propellant, conventionally known one can be widely used; chlorofluorocarbon-series compounds such as chlorofluorocarbon-11, chlorofluorocarbon-12, chlorofluorocarbon-21, chlorofluorocarbon-22, chlorofluorocarbon-113, chlorofluorocarbon-114, chlorofluorocarbon-123, chlorofluorocarbon-142c, chlorofluorocarbon-134a, chlorofluorocarbon-227, chlorofluorocarbon-C318, and 1,1,1,2-tetrafluoroethane, hydrocarbons such as propane, isobutane, and n-butane, ethers such as diethyl ether, compressed gases such as gaseous nitrogen and gaseous carbon dioxide and the like can be mentioned.

[0067]

Here, as examples of the surfactant, oleic acid, lecithin, diethyleneglycol dioleate, tetrahydroflurfuryl oleate, ethyl oleate, isopropyl myristate, glyceryl trioleate, glyceryl monolaurate, glyceryl monooleate, glyceryl monostearate, glyceryl monolysinoate, cetyl alcohol, stearyl alcohol, polyethyleneglycol 400, cetylpyridinium chloride, sorbitan

trioleate (trade name Span 85), sorbitan monoleate (trade name Span 80), sorbitan monolaurate (trade name Span 20), polyoxyethylene hardened castor oil (trade name HCO-60), polyoxyethylene (20) sorbitan monolaurate (trade name Tween
 5 20), polyoxyethylene (20) sorbitan monoleate (trade name Tween 80), lecithin of natural resource origin (trade name EPICLON), oleylpolyoxyethylene (2) ether (trade name Brij 92), stearyl polyoxyethylene (2) ether (trade name Brij 72), lauryl polyoxyethylene (4) ether (trade name Brij 30),
 10 oleylpolyoxyethylene (2) ether (trade name Genapol 0-020), block copolymer of oxyethylene and oxypropylene (trade name Synperonic) and the like can be mentioned. As examples of the oil, corn oil, olive oil, cottonseed oil, sunflower oil and the like can be mentioned. In the case of an ointment, an
 15 appropriate pharmaceutically acceptable base (yellow petrolatum, white petrolatum, paraffin, plastibase, silicone, white ointment, beeswax, lard, vegetable oils, hydrophilic ointment, hydrophilic petrolatum, purified lanolin, hydrolyzed lanolin, water-absorbing ointment, hydrophilic plastibase,
 20 macrogol ointment and the like) is blended with an aptamer of the present invention, which is the active ingredient, and used as a preparation.

[0068]

The dosage of the pharmaceutical of the present invention
 25 varies depending on the kind and activity of active ingredient, seriousness of disease, animal species being the subject of administration, drug tolerability of the subject of administration, body weight, age and the like, and the usual dosage, based on the amount of active ingredient per day for
 30 an adult, can be about 0.0001 to about 100 mg/kg, for example, about 0.0001 to about 10 mg/kg, preferably about 0.005 to about 1 mg/kg.

[0069]

The present invention also provides a solid phase carrier
 35 having the aptamer and/or the complex of the present invention

immobilized thereon. As examples of the solid phase carrier, a substrate, a resin, a plate (e.g., multiwell plate), a filter, a cartridge, a column, and a porous material can be mentioned. The substrate can be one used in DNA chips, protein chips and
5 the like; for example, nickel-PTFE (polytetrafluoroethylene) substrates, glass substrates, apatite substrates, silicon substrates, alumina substrates and the like, and substrates prepared by coating these substrates with a polymer and the like can be mentioned. As examples of the resin, agarose
10 particles, silica particles, a copolymer of acrylamide and N,N'-methylenebisacrylamide, polystyrene-crosslinked divinylbenzene particles, particles of dextran crosslinked with epichlorohydrin, cellulose fiber, crosslinked polymers of aryl dextran and N,N'-methylenebisacrylamide, monodispersed
15 synthetic polymers, monodispersed hydrophilic polymers, Sepharose, Toyopearl and the like can be mentioned, and also resins prepared by binding various functional groups to these resins were included. The solid phase carrier of the present invention can be useful in, for example, purifying, detecting
20 and quantifying chymase.

[0070]

The aptamer and/or the complex of the present invention can be immobilized onto a solid phase carrier by a method known per se. For example, a method that introduces an
25 affinity substance (e.g., those described above) or a predetermined functional group into the aptamer and/or the complex of the present invention, and then immobilizing the aptamer or complex onto a solid phase carrier via the affinity substance or predetermined functional group can be mentioned.
30 The present invention also provides such methods. The predetermined functional group can be a functional group that can be subjected to a coupling reaction; for example, an amino group, a thiol group, a hydroxyl group, and a carboxyl group can be mentioned. The present invention also provides an
35 aptamer having such a functional group introduced thereto.

[0071]

The present invention also provides a method of purifying and concentrating chymase. In particular, the present invention makes it possible to separate chymase from the proteins of other family proteins. The method of purification and concentration of the present invention can comprise adsorbing chymase to the solid phase carrier of the present invention, and eluting the adsorbed chymase with an eluent. Adsorption of chymase to the solid phase carrier of the present invention can be achieved by a method known per se. For example, a chymase-containing sample (e.g., bacterial or cell culture or culture supernatant, blood) is introduced into the solid phase carrier of the present invention or a composition containing the same. Chymase can be eluted using an eluent such as a neutral solution. There is no limitation on the neutral eluent, which can have a pH of, for example, about 6 to about 9, preferably about 6.5 to about 8.5, and more preferably about 7 to about 8. The neutral solution can also comprise, for example, urea, a chelating agent (e.g., EDTA), a sodium salt (e.g., NaCl), a potassium salt (e.g., KCl), a magnesium salt (e.g., MgCl₂), a surfactant (e.g., Tween 20, Triton, NP40), and glycerin. The method of purification and concentration of the present invention can further comprise washing the solid phase carrier using a washing solution after chymase adsorption. Examples of the washing solution include those containing urea, a chelating agent (e.g., EDTA), Tris, an acid, an alkali, Transfer RNA, DNA, surfactants such as Tween 20, salts such as NaCl and the like. The method of purification and concentration of the present invention can still further comprise heating the solid phase carrier. This step enables the regeneration and sterilization of the solid phase carrier.

[0072]

The present invention also provides a method of detecting and quantifying chymase. In particular, the present invention

makes it possible to detect and quantify chymase separately from the proteins of other family proteins. The method of detection and quantitation of the present invention can comprise measuring chymase by utilizing the aptamer of the present invention (e.g., by the use of the complex and solid phase carrier of the present invention). The method of detecting and quantifying chymase can be performed in the same manner as an immunological method, except that the aptamer of the present invention is used in place of an antibody.

10 Therefore, by using the aptamer of the present invention as a probe in place of an antibody, in the same manner as such methods as enzymeimmunoassay (EIA) (e.g., direct competitive ELISA, indirect competitive ELISA, sandwich ELISA), radioimmunoassay (RIA), fluorescent immunoassay (FIA), Western blot technique, immunohistochemical staining method, and cell sorting method, detection and quantitation can be performed. The aptamer of the present invention can also be used as a molecular probe for PET and the like. These methods can be useful in, for example, measuring chymase contents in living organisms or biological samples, and in diagnosing a disease associated with chymase.

20

[0073]

The disclosures in all publications mentioned herein, including patents and patent application specifications, are incorporated by reference herein in the present invention to the extent that all of them have been given expressly.

25

[0074]

The present invention is hereinafter described in more detail by means of the following Examples, which, however, never limit the scope of the invention.

30

Examples

[0075]

Example 1: Preparation of RNA aptamers that bind specifically to chymase (1)

35 RNA aptamers that bind specifically to chymase were

prepared using the SELEX method. SELEX was performed with improvements of the method of Ellington et al. (Ellington and Szostak, Nature 346, 818-822, 1990) and the method of Tuerk et al. (Tuerk and Gold, Science 249, 505-510, 1990). Chymase
 5 (Human Skin, manufactured by Calbiochem) immobilized on NHS-activated Sepharose 4 Fast Flow (manufactured by GE Healthcare) carrier was used as a target molecule. Chymase immobilization to the carrier was performed as directed in the specifications by GE Healthcare. The amount immobilized was
 10 confirmed by examining the chymase solution before immobilization and the supernatant just after immobilization by SDS-PAGE. As a result of the SDS-PAGE, no band of chymase was detected in the supernatant; it was confirmed that nearly all of the chymase used had been coupled. This means that
 15 about 167 pmol of chymase was immobilized to about 3 μ L of the resin.

[0076]

The RNA used in the first round (40N) was obtained by transcribing a chemically synthesized DNA using the
 20 DuraScribe™ T7 Transcription Kit (manufactured by Epicentre). The RNA obtained by this method has the 2'-position of ribose of the pyrimidine nucleotide fluoro-substituted. The following DNA of 70 nucleotides long, having a primer sequence at each end of a 40-nucleotide random sequence, was used as a DNA
 25 template. The DNA template and primers used were prepared by chemical synthesis.

[0077]

DNA template: 5'-

GCGGCCGCTCTTCTATGNNNGAATT

30 CCTACCGT-3' (SEQ ID NO: 1)

Primer Fwd: 5'-TAATACGACTCACTATAGGGACGGTAGGAATTC-3' (SEQ ID NO: 2)

Primer Rev: 5'-GCGGCCGCTCTTCTATG-3' (SEQ ID NO: 3)

[0078]

35 The sequential Ns in the DNA template (SEQ ID NO: 1) are

40 nucleotides in any combinations (40N: each N is A, G, C or T), producing a sequence region unique to each aptamer obtained. The primer Fwd comprises a promoter sequence of T7 RNA polymerase. The variation of the RNA pool used in the first round was theoretically 10^{14} .

[0079]

The RNA pool was added to the chymase-immobilized carrier, and allowed to stand at room temperature for 30 minutes. Then, to remove the RNA not bound to chymase, the resin was washed with solution A. Here, the solution A was a mixed solution of 145 mM sodium chloride, 5.4 mM potassium chloride, 1.8 mM calcium chloride, 0.8 mM magnesium chloride, and 20 mM Tris. The RNA bound to chymase was heated at 95°C for 10 minutes with the addition of solution B as an eluent, and recovered from the supernatant. Here, the solution B was a mixture of 7M Urea, 3 mM EDTA, and 100 mM Tris-HCl (pH 6.6). The recovered RNA was amplified by RT-PCR and transcribed using the DuraScribe™ T7 Transcription Kit, and this was used as the pool for the next round. With this procedure taken as 1 round, the same operation was performed plural times. After completion of SELEX, the PCR product was cloned into pGEM-T Easy vector (manufactured by Promega), and the Escherichia coli strain DH5α (manufactured by Toyobo) was transformed therewith. After the plasmid was extracted from a single colony, the base sequences of clones were determined using a DNA sequencer (3130xl Genetic Analyzer, manufactured by ABI).

[0080]

After 8 rounds of SELEX, the sequences of 44 clones were sequenced; sequence convergence was seen. The sequences of some of the clones are shown by SEQ ID NO: 4-20. Among the sequences, there existed 6 sequences shown by SEQ ID NO: 4, 2 sequences shown by SEQ ID NO: 5, and 1 sequence shown by SEQ ID NO: 6-20. SEQ ID NO: 6 and 8 differed only by one base. The sequences of SEQ ID NO: 4, 13, and 14 were found to contain the common sequence shown by SEQ ID NO: 21, which was

present in 9 of the 44 clones. The secondary structures of these sequences were predicted using the MFOLD program (M. Zuker, Nucleic Acids Res. 31(13), 3406-3415, 2003); the portions formed by the common sequence portion had a similar
 5 loop structure. Putative secondary structures of the aptamers of the sequences shown by SEQ ID NO: 4, 5, 12-14, and 18 are given in Fig. 1, wherein each portion formed by the common sequence shown by SEQ ID NO: 21 is enclosed in a circle.
 [0081]

10 Given below are the respective nucleotide sequences. Unless otherwise stated, the following individual sequences are shown in the direction from 5' to 3', with the purine bases (A and G) being in the 2'-OH form, and the pyrimidine
 15 bases (U and C) in the 2'-fluoro-modified form. In the sequences, each of N₁ and N₂ indicates any nucleotides out of A, G, C, and U, and X₁ and X₂ are both A or both G.
 [0082]

SEQ ID NO: 4:

GGGACGGUAGGAAUUCGUCCAUUCUACAGAUAGAGAUAAAGUAGAAUUUAACAAAACAUAGA
 20 AGAGCGGCCCGC

SEQ ID NO: 5:

GGGACGGUAGGAAUUCCACUUGUCUUUGAGGCAAGAAUUGUAUUCGGAAGAAGCAUAGAA
 GAGCGGCCCGC

SEQ ID NO: 6:

25 GGGACGGUAGGAAUUCUACGGUCUGUGUGAAAUUGAAACACACAAAGAACAUAUAGACAUAGA
 AGAGCGGCCCGC

SEQ ID NO: 7:

GGGACGGUAGGAAUUCACCUUCCAAUUGUGAAAGAAACACAAAAAGAAAUGACAUCAUAGA
 AGAGCGGCCCGC

30 SEQ ID NO: 8:

GGGACGGUAGGAAUUCUACGGUCUGUGUGAAAUUGAAACACACAAAGAACAUAUAAACAUAGA
 AGAGCGGCCCGC

SEQ ID NO: 9:

GGGACGGUAGGAAUUCCCGAAAAGCAACAAGCUUGCUGUAAAUGAUUCCGAAAAAACACAUAG
 35 AAGAGCGGCCCGC

SEQ ID NO: 10:

GGGACGGUAGGAAUCCGCGCCUAAAAACGACGAUUAUACAGAAACGUCAAUACAUAGA
AGAGCGGCCCGC

SEQ ID NO: 11:

5 GGGACGGUAGGAAUCCCGACACGAAUGUGUGAUUAAUCCGAACAACAAAGUACAUAGA
AGAGCGGCCCGC

SEQ ID NO: 12:

GGGACGGUAGGAAUUCGCGUCAACGUUACUAAUGUAUAUACCAGGGUAAACUAAACAUAGA
AGAGCGGCCCGC

10 SEQ ID NO: 13:

GGGACGGUAGGAAUCCGCAACCAUCCCGUAAUAUGGUUAGAUAGAGUUAAAAACCAUAGA
AGAGCGGCCCGC

SEQ ID NO: 14:

GGGACGGUAGGAAUUCUGUCCUGACAGCAUUGAGAUAGAUUUAACAAACGCACAUAGA
15 AGAGCGGCCCGC

SEQ ID NO: 15:

GGGACGGUAGGAAUCCCGAGAAAUAUUUCCGAAGAAAACAACAAUUUUUGCAAACAUAGA
AGAGCGGCCCGC

SEQ ID NO: 16:

20 GGGACGGUAGGAAUCCCAUGACUGAAAAACGUCAGUAAAAUCCGAAAAUCAUAUCAUAGAA
GAGCGGCCCGC

SEQ ID NO: 17:

GGGACGGUAGGAAUCCGUUCGCAGAAACGAACUUUUAAAAAUGUACGUGGGAGCACAUAG
AAGAGCGGCCCGC

25 SEQ ID NO: 18:

GGGACGGUAGGAAUUCGAACGACAAUUAUAGAACUUCGUUUGACAUUCCACACCACAUAGA
AGAGCGGCCCGC

SEQ ID NO: 19:

GGGACGGUAGGAAUCCCGACUGCAAUUCAGCAGAAAAAAUCCGAAAAACACACACCAUAGA
30 AGAGCGGCCCGC

SEQ ID NO: 20:

GGGACGGUAGGAAUUCAAAUCAGCUGAUUUGUAAUUUUUUACACAGGCAAACACAUAGA
AGAGCGGCCCGC

SEQ ID NO: 21:

35 X₁GAUAGAN₁N₂UAAX₂

[0083]

After the above-described 8 rounds, SELEX was continued under the similar conditions. After completion of the 11th round, the sequences of 93 clones were sequenced. Some of the sequences of the clones are shown by SEQ ID NO: 22-27. A number of sequences were identical to some of the sequences obtained after the 8 rounds; there existed 22 sequences shown by SEQ ID NO: 4 and 4 sequences shown by SEQ ID NO: 14. This means that the common sequence shown by SEQ ID NO: 21 was concentrated. There also existed 1 sequence shown by SEQ ID NO: 5, 3 sequences shown by SEQ ID NO: 22, and 2 sequences shown by SEQ ID NO: 23 and 24. One sequence was shown by SEQ ID NO: 25-27. SEQ ID NO: 22 and 11 differed only by one base. SEQ ID NO: 26 and 4 differed only by one base. The common sequence shown by SEQ ID NO: 21 was present in 35 of the 93 clones. Of the sequences that newly emerged by the 11th round, those shown by SEQ ID NO: 25 and 26 contained the common sequence shown by SEQ ID NO: 21. Putative secondary structures of the aptamers of the sequences shown by SEQ ID NO: 22-27 are given in Fig. 2, wherein each portion formed by the common sequence shown by SEQ ID NO: 21 is enclosed in a circle. All these portions had a characteristic loop structure, as in Fig. 1.

[0084]

Given below are the respective nucleotide sequences. Unless otherwise stated, the following individual sequences are shown in the direction from 5' to 3', with the purine bases (A and G) being in the 2'-OH form, and the pyrimidine bases (U and C) in the 2'-fluoro-modified form.

[0085]

SEQ ID NO: 22:

GGGACGGUAGGAAUCCCGACACAAAUGUGUGAUUAAUCCGAACAACAAAGUAACAUAGA
AGAGCGGCCGC

SEQ ID NO: 23:

GGGACGGUAGGAAUCAUAUGUACUCCGUCCUGACAAAUGUCAAAUGACAAACGUUCAUAGA

AGAGCGGCCGC

SEQ ID NO: 24:

GGGACGGUAGGAAUCCCUCAUAGUAGAAUGUUGGUUUCUACAAAAGCGACAAGCAUAGAA
GAGCGGCCGC

5 SEQ ID NO: 25:

GGGACGGUAGGAAUUCAGCUGACUCCAAUGCACACGUAGAUAGAGUAAAACGUUGCAUAGA
AGAGCGGCCGC

SEQ ID NO: 26:

GGGACGGUAGGAAUUCGUCGAUUCUACAGAUAGAGAUAAAGUAGAAUUUAACAAAACAUAGA
10 AGAGCGGCCGC

SEQ ID NO: 27:

GGGACGGUAGGAAUCCGUCAUCGGUUGCAAUUGAAAUAACAAAACAAGGACAACCAUAGA
AGAGCGGCCGC

[0086]

15 After the above-described 8 rounds of SELEX, SELEX was continued using chymase (Human Skin, manufactured by Calbiochem), immobilized on Heparin Sepharose 6 Fast Flow (manufactured by GE Healthcare) carrier, as a target molecule. The chymase in solution was added to the carrier and retained
20 at room temperature for 30 minutes, whereby the chymase was immobilized to the carrier. The amount immobilized was checked by examining the chymase solution before immobilization and the supernatant just after immobilization by SDS-PAGE. The results of the SDS-PAGE detected no chymase band in the
25 supernatant, confirming that almost all of the chymase used was immobilized. It was evident that about 100 pmol of chymase was immobilized to about 3 μ L of the resin.

[0087]

The pool at the 11th round was cloned, and the sequences
30 of 79 clones were determined. The sequences of some of these clones are shown by SEQ ID NO: 28-34. There were a number of sequences identical to the sequences obtained after the above-described 8 rounds; there existed 9 sequences shown by SEQ ID NO: 4 and 1 sequence shown by SEQ ID NO: 19. There were a
35 number of sequences identical to the sequences obtained after

the above-described 11 rounds; there existed 2 sequences shown by SEQ ID NO: 27. Additionally, there existed 4 sequences shown by SEQ ID NO: 28, 2 sequences shown by SEQ ID NO: 29, and 1 sequence shown by SEQ ID NO: 30-34. SEQ ID NO: 30 and 31 differed only by one base. SEQ ID NO: 32 is a sequence resulting from deletion of one base from SEQ ID NO: 31. The common sequence shown by SEQ ID NO: 21 was present in 14 of the 79 clones. Of the sequences that newly emerged by the 11th round, those of SEQ ID NO: 30-32 and 34 were found to comprise the common sequence shown by SEQ ID NO: 21. Putative secondary structures of the aptamers of the sequences shown by SEQ ID NO: 28-34 are given in Fig. 3, wherein each portion formed by the common sequence shown by SEQ ID NO: 21 is enclosed in a circle. All these portions, except for the clone shown by SEQ ID NO: 34, had a characteristic loop structure, as in Fig. 1.

[0088]

Given below are the nucleotide sequences shown by SEQ ID NO: 28-34, respectively. Unless otherwise stated, the following individual sequences are shown in the direction from 5' to 3', with the purine bases (A and G) being in the 2'-OH form, and the pyrimidine bases (U and C) in the 2'-fluoro-modified form.

SEQ ID NO: 28:

GGGACGGUAGGAAUUCAAUUUCUUUCUAUUCUCACCUGAGUAUAUCAGGCACAGUACAUAGA
AGAGCGGCCGC

SEQ ID NO: 29:

GGGACGGUAGGAAUUCACGACCGCCCAAAAAUGGUGACAUUUUAGAAACACCGAACAUAGA
AGAGCGGCCGC

SEQ ID NO: 30:

GGGACGGUAGGAAUUCGUCCCUCUUGUCUAUUUUGCAGAUAGACUUAAGCAAACAUAGAAG
AGCGGCCGC

SEQ ID NO: 31:

GGGACGGUAGGAAUUCGUCCCUCUUGUCUAUUUUGCAGAUAGACUUAAGCAAACAUAGAAG
AGCGGCCGC

SEQ ID NO: 32:

GGGACGGUAGGAAUUCGUCCUCAUGUCUAUUUUGCAGAUAGACUAAAAGCAAACAUAAGAAGA
GCGGCCGC

SEQ ID NO: 33:

GGGACGGUAGGAAUUCUGUCUUUUCACGCAACAAAUACAGAGCUUUGCAAAACAUAAGA
5 AGAGCGGCCGC

SEQ ID NO: 34:

GGGACGGUAGGAAUUCUGCCGCAACCCAAUGAAAACGAAGAUAGAGAUAAAUCGAACAUAAGA
AGAGCGGCCGC

[0089]

10 The binding activities against chymase of the nucleic
acids shown by SEQ ID NO: 4-20 and 22-34 were determined by
the surface plasmon resonance method using Biacore T100
(manufactured by GE Healthcare). The sensor chip used was
the SA chip, which had streptavidin immobilized thereon. Bound
15 thereto was about 1500 RU of a 16-nucleotide Poly dT with
biotin bound to the 5' end thereof. The ligand nucleic acid
had a 16-nucleotide Poly A added to the 3' end thereof, and
was immobilized to the SA chip by annealing between T and A.
20 μ L of each nucleic acid was injected at a flow rate of 20
 μ L/min, and about 1000 RU nucleic acid was immobilized. 20 μ L
of chymase for analyte, prepared at 0.2 μ M, was injected.
Solution A was used as a running buffer.
[0090]

25 All sequences examined were found to bind to chymase
(Table 1). However, the nucleic acid pool (40N) used at the
1st round, which contained a random sequence of 40 nucleotides
serving as a negative control, was also found to exhibit weak
binding activity against chymase. Hence, in Table 1, aptamers
with higher binding activity than 40N are represented by ++,
30 and those with equivalent binding activity compared with 40N
are represented by +. A sensorgram showing how the aptamers
shown by SEQ ID NO: 12 and 13 bound to chymase is given in Fig.
4.

Irrespective of whether the common sequence shown by SEQ
35 ID NO: 21 was present or absent, some sequences exhibited

higher binding activity than 40N, and others exhibited
equivalent binding activity compared with 40N. SEQ ID NO: 4,
13, 14, 25, 26, and 30, which comprise this common sequence,
exhibited higher binding activity than 40N, whereas SEQ ID NO:
5 31, 32, and 34, which comprise the same common sequence,
exhibited equivalent binding activity compared with 40N. It
was found that the N_1N_2 contained in the sequence of SEQ ID NO:
21 may be GA, GU, UU, or CU, and that the X_1 and X_2 contained
in the sequence of SEQ ID NO: 21 may be both A.
10 [0091]
[Table 1]

SEQ ID NO	Length	Binding activity as determined using Blacore
4	73	++
5	72	++
6	73	++
7	73	++
8	73	++
9	74	++
10	73	++
11	73	++
12	73	++
13	73	++
14	73	++
15	73	++
16	72	++
17	74	++
18	73	++
19	73	++
20	73	+
22	73	+
23	73	++
24	72	++
25	73	++
26	73	++
27	73	++
28	73	+
29	73	++
30	71	++
31	71	+
32	70	+
33	73	+
34	73	+

[0092]

Table 1: Binding activity for chymase.

"++" represents a sequence that binds to chymase significantly
 5 more strongly than the negative control 40N. "+" represents a
 sequence that binds to chymase equivalently compared with the
 negative control 40N. Here, 40N represents the nucleic acid
 pool used in the 1st round, which comprises a random sequence
 of 40 nucleotides.

[0093]

Example 2: Preparation of RNA aptamers that bind specifically to chymase (2)

SELEX was performed in the same manner as Example 1, but
5 using a template whose random sequence was of 30 nucleotides,
and a primer sequence different from that used in Example 1.
The target molecule used in the SELEX was chymase (recombinant,
manufactured by SIGMA), immobilized on NHS-activated Sepharose
4 Fast Flow (manufactured by GE Healthcare) carrier. The
10 sequences of the template and primers used are shown below.
The DNA template and primers were chemically synthesized.

[0094]

DNA template: 5'-

Primer Fwd: 5'-TAATACGACTCACTATAGGGAGCAGGAGAGAGGTCAGATG-3'
(SEQ ID NO: 36)

Primer Rev: 5'-TCACACTAGCACGCATAGG-3' (SEQ ID NO: 37)

[0095]

20 The sequential Ns in the DNA template (SEQ ID NO: 35) are
30 nucleotides in any combinations (30N: each N is A, G, C or
T), producing a sequence region unique to each aptamer
obtained. The Primer Fwd comprises a promoter sequence of T7
RNA polymerase. The variation of the RNA pool used in the
25 first round was theoretically 10^{14} .

[0096]

The RNA pool was added to the carrier with chymase immobilized thereon, and retained at room temperature for 30 minutes, after which the resin was washed with solution C to eliminate the RNA not bound to the chymase. Here, the solution C was a mixed solution of 145 mM sodium chloride, 5.4 mM potassium chloride, 1.8 mM calcium chloride, 0.8 mM magnesium chloride, 20 mM Tris (pH 7.6), and 0.05% Tween 20. The RNA bound to the chymase was recovered by adding solution D as an eluent, and stirring the mixture at room temperature for 10

minutes. Here, the solution D was prepared by adding 6M guanidine hydrochloride to the solution C to obtain a pH of 7.6. Elution was performed in 3 cycles. The RNA recovered was amplified by RT-PCR, and transferred using the DuraScribe™ T7
5 Transcription Kit for use as a pool in the next round. Each round of these steps was repeated a plurality of times. After completion of SELEX, the PCR product was cloned into the pGEM-T Easy vector (manufactured by Promega), and Escherichia coli strain DH5α (manufactured by Toyobo) was transformed therewith.
10 After the plasmid was extracted from a single colony, the clones were sequenced using a DNA sequencer (3130xl Genetic Analyzer, manufactured by ABI).

After completion of 8 rounds of SELEX, the sequences were determined; sequence convergence was not seen. Hence, 2 mg/mL
15 heparin as a competing agent was added, and SELEX was continued to the 11th round. The sequences of 40 clones were determined, and convergence was seen; the sequences of all the 40 clones were found to contain the common sequence shown by SEQ ID NO: 21. The sequences of some of these clones are shown
20 by SEQ ID NO: 38-48. There existed 6 sequences shown by SEQ ID NO: 38, 2 sequences shown by SEQ ID NO: 39, and 1 sequence shown by SEQ ID NO: 40-48.

Putative secondary structures of the aptamers of the sequences shown by SEQ ID NO: 38-40, 43, and 48 are given in
25 Fig. 5, wherein each portion formed by the common sequence shown by SEQ ID NO: 21 is enclosed in a circle. In many of these portions, the common sequence shown by SEQ ID NO: 21 formed a characteristic loop structure similar to that shown in Fig. 1.

30 [0097]

Given below are the nucleotide sequences shown by SEQ ID NO: 38-48, respectively. Unless otherwise stated, the following individual sequences are shown in the direction from 5' to 3', with the purine bases (A and G) being in the 2'-OH
35 form, and the pyrimidine bases (U and C) in the 2'-fluoro-

modified form.

[0098]

SEQ ID NO: 38:

GGGAGCAGGAGAGAGGUCAGAUGGAUAGAGUUAAGAUCUGGCUGGCGCAUUAGCCUAUGCGU
5 GCUAGUGUGA

SEQ ID NO: 39:

GGGAGCAGGAGAGAGGUCAGAUGGUUACGGAUAGAGUUAAGGUAACGGUACGGCCUAUGCGU
GCUAGUGUGA

SEQ ID NO: 40:

10 GGGAGCAGGAGAGAGGUCAGAUGAACGGAUAGAGCUAAGAGUUCGUCAGAGGGGCCUAUGCG
UGCUAGUGUGA

SEQ ID NO: 41:

GGGAGCAGGAGAGAGGUCAGAUGGUGAGAUAGAGUUAACACCACAAUAGUAGCCUAUGCGU
GCUAGUGUGA

15 SEQ ID NO: 42:

GGGAGCAGGAGAGAGGUCAGAUGCGUGAUCGUGCAAGGCGGAUAGAGUUAAGGCCUAUGCGU
GCUAGUGUGA

SEQ ID NO: 43:

GGGAGCAGGAGAGAGGUCAGAUGCCAAGAUAGAUUUAAAUGGCGUUUGGGCCUAUGCGU
20 GCUAGUGUGA

SEQ ID NO: 44:

GGGAGCAGGAGAGAGGUCAGAUGUUAGACCAAAGCAUAGGAGAUAGAGUUAACCUAUGCGU
GCUAGUGUGA

SEQ ID NO: 45:

25 GGGAGCAGGAGAGAGGUCAGAUGGACCACCGAUGGGCAAGAUAGAGUUAUAUGCCUAUGCGU
GCUAGUGUGA

SEQ ID NO: 46:

GGGAGCAGGAGAGAGGUCAGAUGGGACAGAUAGAGUUAAGUCCGUUACGUGGCCUAUGCGU
GCUAGUGUGA

30 SEQ ID NO: 47:

GGGAGCAGGAGAGAGGUCAGAUGGUGAUAGAUAGAGUUAUAUUCGUGAAUGGCCUAUGCGU
GCUAGUGUGA

SEQ ID NO: 48:

GGGAGCAGGAGAGAGGUCAGAUGUGAAGAUAGAGAUAAUACAUACAGUCGGCCUAUGCGU
35 GCUAGUGUGA

[0099]

The binding activities against chymase of the nucleic acids shown by SEQ ID NO: 38-48 were evaluated by the surface plasmon resonance method. In the evaluations for SEQ ID NO: 38-48, measurements were taken in the same manner as Example 1. Solution C was used as a running buffer. The results of the measurements are shown in Table 2.

The nucleic acids shown by SEQ ID NO: 38-48 were identified as aptamers that bind to chymase significantly more potently than 30N. It was found that the X₁ and X₂ contained in the common sequence SEQ ID NO: 21 may be both A or both G, and that the N₁N₂ contained in the common sequence may be GU, GC, GA, or UU.

[0100]

15 [Table 2]

SEQ ID NO:	Length	Binding activity as determined using Biacore
38	72	++
39	72	++
40	73	++
41	72	++
42	72	++
43	72	++
44	72	++
45	72	++
46	72	++
47	72	++
48	72	++

[0101]

Table 2: Binding activity for chymase.

"++" indicates a sequence that binds to chymase significantly more strongly than the negative control 30N. Here, 30N represents the nucleic acid pool used in the 1st round, which comprises a random sequence of 30 nucleotides.

[0102]

Example 3: Determination of chymase inhibitory activity using synthetic substrate

Whether the nucleic acids shown by SEQ ID NO: 4-20, 22-34,

and 38-48 inhibit the enzyme activity of chymase was determined as described below. The chymase substrate used was Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-MCA (manufactured by Peptide Institute, Inc.), which contains the 4-amino-acid peptide Ala-Ala-Pro-Phe, 5 a standard substrate for chymotrypsin-like proteases. Here, Suc is a protecting succinyl group, and MCA is a 4-methylcoumaryl-7-amide group; upon cleavage of the C-terminal side of phenylalanine, AMC (7-amino-4-methylcoumarine) is released. By detecting the fluorescence of this AMC, the 10 enzyme activity of chymase can be determined. The assay was performed using a 96-well plate (F16 Black Maxisorp Fluoronunc, manufactured by Nunc), with a reaction mixture volume of 100 μ L, in solution C as a buffer solution. First, each nucleic acid was serially diluted to 0.0027-2 μ M concentrations in solution 15 C to obtain 50 μ L solutions. After 10 μ L of the 1 mM substrate prepared in solution C was added thereto, the plate was set to the microplate reader SpectraMax190 (manufactured by Molecular Devices Corporation), and incubated at 37°C for 5 minutes. Separately, 0.05 μ g (or 0.005 μ g) of chymase (recombinant, 20 manufactured by SIGMA) was diluted in solution C to obtain a 40 μ L chymase solution, and incubated at 37°C for 5 minutes. The chymase solution was added to the mixture of the nucleic acid and substrate to initiate an enzyme reaction. The final chymase concentration in the reaction mixture was 16.7 nM (or 25 1.67 nM), the final substrate concentration being 100 μ M. The plate containing the reaction mixture was set to the microplate reader SpectraMax190 (manufactured by Molecular Devices Corporation), and examined for time-dependent changes in the fluorescence intensity at 37°C for 5 minutes (or 30 30 minutes) (excitation wavelength 380 nm, detection wavelength 460 nm). A linear approximation of the increase in the fluorescence of the AMC released from the substrate by chymase activity was generated, and its slope was taken as the initial velocity ($V_{\max}$). For control, samples were treated and analyzed 35 in the same manner in two cases: use of a 30N or 40N (a

nucleotide of 30 or 40 consecutive bases represented by N; N is A, G, C or T) nucleic acid pool (negative control), and use of chymostatin, a known chymotrypsin-like serine protease inhibitor (positive control). Taking the initial reaction velocity without the nucleic acid and inhibitor (V_0) as a 100% enzyme activity, the inhibitory rate of each test substance was calculated using the following equation:

$$\text{Inhibitory rate (\%)} = (1 - V_{\text{max}}/V_0) \times 100$$

10

The inhibitor concentration required to cause a 50% inhibition of the enzyme activity (IC_{50}) was determined. The results are shown in Table 3.

[0103]

15 [Table 3]

SEQ ID NO:	IC_{50} [μM]	SEQ ID NO:	IC_{50} [μM]
4	0.049 ± 0.003	25	0.079 ± 0.028
5	0.080 ± 0.039	26	0.106 ± 0.004
6	0.456 ± 0.261	27	>0.5
7	>0.5	28	0.045 ± 0.004
8	0.453 ± 0.463	29	>0.5
9	0.273 ± 0.069	30	0.147 ± 0.044
10	>0.5	31	0.155 ± 0.039
11	0.145 ± 0.036	32	0.235 ± 0.055
12	0.128 ± 0.023	33	0.145 ± 0.088
13	0.058 ± 0.024	34	0.137 ± 0.009
14	0.061 ± 0.053	38	0.050 ± 0.012
15	0.285 ± 0.021	40	0.140 ± 0.085
16	>0.5	41	0.060 ± 0.017
17	0.092 ± 0.042	42	0.124 ± 0.026
18	0.058 ± 0.021	43	0.081 ± 0.050
19	0.163 ± 0.001	44	0.049 ± 0.013
20	0.282 ± 0.013	45	0.074 ± 0.011
22	0.105 ± 0.009	46	0.038 ± 0.004
23	0.238 ± 0.060	47	0.058 ± 0.012
24	0.092 ± 0.003	48	0.095 ± 0.018

[0104]

Table 3: Inhibitory activity against chymase (IC_{50}).

">0.5" indicates that no inhibitory activity was observed in the concentration range up to 0.5 μM . Each IC_{50} value is a mean

value for 2 to 3 measurements.

[0105]

The negative control 30N or 40N did not exhibit inhibitory activity ($IC_{50} > 0.5 \mu M$). The positive control
5 chymostatin exhibited IC_{50} values of $0.1 \mu M - 0.2 \mu M$.

In summary, many of the aptamers listed in Table 3 exhibited inhibitory activity against chymase. The aptamers exhibiting IC_{50} values of $0.1 \mu M$ or less, in particular, can be judged to have an excellent inhibitory effect. The aptamers
10 comprising the common sequence shown by SEQ ID NO: 21 all exhibited inhibitory activity. These findings demonstrate that the X_1 and X_2 contained in the common sequence may be both A or both G, and that the N_1N_2 may be any of GA, GU, GC, UU, and CU.

[0106]

15 Example 4: Truncation of aptamer

The aptamers shown by SEQ ID NO: 4, 12, 13, and 14 were shortened. The aptamers shown by SEQ ID NO: 4, 13, and 14 comprise the common sequence shown by SEQ ID NO: 21. SEQ ID
20 NO: 12 is an aptamer that does not comprise this common sequence. The sequences of shortened aptamers are shown in SEQ ID NO: 49-57. Putative secondary structures of the aptamers shown by SEQ ID NO: 49, 51, and 55-57 are given in Fig. 6, wherein each portion formed by the common sequence shown by SEQ ID NO: 21 is enclosed in a circle.

25 [0107]

Given below are the nucleotide sequences shown by SEQ ID NO: 49-57, respectively. Unless otherwise stated, the following individual sequences are shown in the direction from
30 5' to 3', with the purine bases (A and G) being in the 2'-OH form, and the pyrimidine bases (U and C) in the 2'-fluoro-modified form.

[0108]

SEQ ID NO: 49:

(a sequence prepared by shortening the clone shown by SEQ ID
35 NO: 4 to a 29-nucleotide length including the common sequence)

GGUUCUACAGAUAGAGAUAAAGUAGAACC

SEQ ID NO: 50:

(a sequence prepared by shortening the clone shown by SEQ ID NO: 4 to a 35-nucleotide length including the common sequence)

5 GGCAUUCUACAGAUAGAGAUAAAGUAGAAUUUAAC

SEQ ID NO: 51:

(a sequence prepared by shortening the clone shown by SEQ ID NO: 12 to a 45-nucleotide length)

CGUUACAUAUUGUAUAUACCAGGGUAAACUAACAUAAGAAGAGCGG

10 SEQ ID NO: 52:

(a sequence prepared by shortening the clone shown by SEQ ID NO: 12 to a 26-nucleotide length)

CCGUUAUAUACCAGGGUAAACUAAACGG

SEQ ID NO: 53:

15 (a sequence prepared by shortening the clone shown by SEQ ID NO: 13 to a 42-nucleotide length including the common sequence)

GGGUAAACUAUGGUUAGAUAGAGUUAAAAACCAUAGAAGACCC

SEQ ID NO: 54:

20 (a sequence prepared by shortening the clone shown by SEQ ID NO: 13 to a 36-nucleotide length including the common sequence)

UAAACUAUGGUUAGAUAGAGUUAAAAACCAUAGAAGA

SEQ ID NO: 55:

25 (a sequence prepared by shortening the clone shown by SEQ ID NO: 13 to a 29-nucleotide length including the common sequence)

CUAUGGUUAGAUAGAGUUAAAAACCAUAG

SEQ ID NO: 56:

30 (a sequence prepared by shortening the clone shown by SEQ ID NO: 13 to a 23-nucleotide length including the common sequence)

GGGUUAGAUAGAGUUAAAAACCC

SEQ ID NO: 57:

35 (a sequence prepared by shortening the clone shown by SEQ ID

NO: 14 to a 27-nucleotide length including the common sequence)

GCAUUUGAGAUAGAUUUAAACAAACGC

[0109]

5 The nucleic acids of SEQ ID NO: 49-57 were all chemically synthesized.

Whether these nucleic acids bind to chymase was determined by the surface plasmon resonance method. Measurements were taken using Biacore T100 (manufactured by GE 10 Healthcare) as described below. About 4000 RU of chymase (recombinant, manufactured by SIGMA) was immobilized on the sensor chip surface of a CM5 chip, using an amine coupling kit. 20 μ L of each nucleic acid, prepared at 0.3 μ M, as an analyte was injected at a flow rate of 20 μ L/min. Solution C was used 15 as a running buffer. The results of the measurements are shown in Table 4. The method of evaluation used was the same as Example 1.

As a result, the nucleic acids other than SEQ ID NO: 52 were identified as aptamers that bind to chymase significantly 20 more potently than the control 40N (Table 4). A sensorgram showing how the aptamers shown by SEQ ID NO: 13, 55, and 56 bound to chymase is given in Fig. 7.

[0110]

Chymase inhibitory activity was determined in the same 25 manner as Example 3. The respective IC₅₀ values are shown in Table 4.

The nucleic acids other than SEQ ID NO: 52 exhibited potent inhibitory activity (Table 4). The results for SEQ ID NO: 51 and 52 showed that the aptamer shown by SEQ ID NO: 12, 30 which does not comprise the common sequence, retained its activity after being shortened to a 45-nucleotide length, and lost the activity when shortened to a 26-nucleotide length.

Meanwhile, the results for SEQ ID NO: 56 showed that the aptamer shown by SEQ ID NO: 13, which comprises the common 35 sequence, could be shortened to a 23-nucleotide length. This

demonstrates that the common sequence shown by SEQ ID NO: 21 is critical to the binding and inhibitory activity against chymase.

Because SEQ ID NO: 49 and 57 also exhibited inhibitory activity, it was shown that the N₁N₂ contained in the common sequence is not limited to GU, and that there is no limitation on the sequence contained in the stem structure of SEQ ID NO: 56 in Fig. 6, as far as the stem structure is retained.

These aptamers are considered to be useful as chymase inhibitors.

[0111]

[Table 4]

SEQ ID NO	Sequence ID number of parent clone	Length	Binding activity as determined using Biacore	IC ₅₀ [μM]
49	4	29	++	0.117±0.066
50	4	35	++	0.138±0.093
51	12	45	++	0.024±0.009
52	12	28	+	>1
53	13	42	++	0.066±0.024
54	13	36	++	0.051±0.033
55	13	29	++	0.055±0.023
56	13	23	++	0.046±0.031
57	14	27	++	0.099±0.013

[0112]

Table 4: Binding activity and inhibitory activity for chymase (IC₅₀).

"++" represents a sequence that binds to chymase significantly more strongly than the negative control 40N. "+" represents a sequence that binds to chymase equivalently compared with the negative control 40N. Here, 40N represents the nucleic acid pool used in the 1st round in Example 1, which comprises a random sequence of 40 nucleotides. ">1" indicates that no inhibitory activity was observed in the concentration range up to 1 μM. Each IC₅₀ value is a mean value for 2 to 3 measurements.

[0113]

The negative control 40N did not exhibit inhibitory activity at concentrations of up to 1 μM (IC₅₀>1 μM). The

positive control chymostatin exhibited IC_{50} values of 0.1 μ M-0.2 μ M.

In summary, the nucleic acids listed in Table 4, other than SEQ ID NO: 52, exhibited inhibitory activity against
5 chymase. The nucleic acids that exhibited IC_{50} values of 0.1 μ M or less, in particular, can be described as having a remarkable inhibitory effect.

[0114]

Example 5: Effect of substitution, deletion of base(s) of
10 shortened aptamer.

Mutation or deletion was introduced into the aptamer shown by SEQ ID NO: 56, and an influence on the binding activity and inhibitory activity was examined. The sequences are shown in SEQ ID NO: 58-68.

15 [0115]

The nucleotide sequences of respective aptamers shown by the following SEQ ID NO: 58-68 are shown below. Unless otherwise specified, the respective sequences recited below are in the direction of from 5' to 3', modification at the 2'-
20 position of ribose (e.g., U(F) shows modification of the 2'-position of ribose of uracil with F) is shown in the parenthesis, and F is a fluorine atom.

[0116]

SEQ ID NO: 58:

25 (sequence containing randomly-placed 13 nucleic acid bases contained in the common sequence of the clone shown by SEQ ID NO: 56)

GGGU(F)U(F)GAAGAU(F)AU(F)U(F)AAAGAAC(F)C(F)C(F)

SEQ ID NO: 59:

30 (sequence wherein N₂ contained in the common sequence of the clone shown by SEQ ID NO: 56 is substituted)

GGGU(F)U(F)AGAU(F)AGAGAU(F)AAAAAC(F)C(F)C(F)

SEQ ID NO: 60:

(sequence wherein N₂ contained in the common sequence of the
35 clone shown by SEQ ID NO: 56 is substituted)

GGGU(F)U(F)AGAU(F)AGAGC(F)U(F)AAAAAC(F)C(F)C(F)

SEQ ID NO: 61:

(sequence wherein N₁ contained in the common sequence of the clone shown by SEQ ID NO: 56 is substituted)

5 GGGU(F)U(F)AGAU(F)AGAU(F)U(F)U(F)AAAAAC(F)C(F)C(F)

SEQ ID NO: 62:

(sequence wherein X₁ and X₂ contained in the common sequence of the clone shown by SEQ ID NO: 56 are substituted)

GGGU(F)U(F)GGAU(F)AGAGU(F)U(F)AAGAAC(F)C(F)C(F)

10 SEQ ID NO: 63:

(sequence wherein base sequence contained in the clone shown by SEQ ID NO: 56 except the common sequence is substituted)

GC(F)U(F)AC(F)AGAU(F)AGAGU(F)U(F)AAAGU(F)AGC(F)

SEQ ID NO: 64:

15 (sequence wherein base sequence contained in the clone shown by SEQ ID NO: 56 except the common sequence is substituted)

GU(F)C(F)AC(F)AGAU(F)AGAGU(F)U(F)AAAGU(F)GAC(F)

SEQ ID NO: 65:

(sequence wherein base sequence contained in the clone shown by SEQ ID NO: 56 except the common sequence is partly substituted and partly deleted)

GGC(F)AGAU(F)AGAGU(F)U(F)AAAGC(F)C(F)

SEQ ID NO: 66:

(sequence wherein purine base contained in the common sequence of the clone shown by SEQ ID NO: 56 is substituted by pyrimidine base)

GGGU(F)U(F)AGAU(F)CGAGU(F)U(F)AAAAAC(F)C(F)C(F)

SEQ ID NO: 67:

(sequence wherein purine base contained in the common sequence of the clone shown by SEQ ID NO: 56 is substituted by pyrimidine base)

GGGU(F)U(F)AGAU(F)ACAGU(F)U(F)AAAAAC(F)C(F)C(F)

SEQ ID NO: 68:

(sequence wherein purine base contained in the common sequence of the clone shown by SEQ ID NO: 56 is substituted by

pyrimidine base)

GGGU(F)U(F)AGAU(F)AGUGU(F)U(F)AAAAAC(F)C(F)C(F)

[0117]

All nucleic acids of SEQ ID NO: 58-68 were prepared by
5 chemical synthesis. Whether these nucleic acids are bound to
chymase was assessed by surface plasmon resonance method in
the same manner as in Example 4. The inhibitory activity on
chymase was measured in the same manner as in Example 3. The
results are shown in Table 5.

10 As a result, it was found that the nucleic acids of SEQ
ID NO: 59-65 from among those shown in Table 5 retained strong
binding force and strong inhibitory activity.

[0118]

Since the binding activity and inhibitory activity of SEQ
15 ID NO: 58 decreased to almost the same level as 40N/30N used
in Examples 1 and 2, it was shown that the common sequence
shown by SEQ ID NO: 21 is important for the binding and
inhibitory activities on chymase. From these results, SEQ ID
NO: 58 was used as a negative control of the shortened aptamer
20 in the following Examples (Examples 5-9).

From the results of SEQ ID NO: 59-61, it was shown that
N₁ and N₂ contained in the common sequence may be any
nucleotides, which are preferably GU, GA, GC and UU. From the
results of SEQ ID NO: 62, it was shown that X₁ and X₂ may be
25 any nucleotides, and are preferably A and G, more preferably
both A or both G.

From the results of SEQ ID NO: 63-65, it was shown that
the base pair sequence (e.g., SEQ ID NO: 56 in Fig. 6) of the
stem structure contained therein except the common sequence
30 may be any nucleotides as long as the stem structure is
maintained, and the length is preferably 3 base pairs or
longer.

From the results of SEQ ID NO: 66-68, the importance of
the common sequence was shown again, since introduction of
35 mutation into the common sequence decreases the activity.

[0119]

[Table 5]

SEQ ID NO:	binding activity using Biacore	IC ₅₀ [μM]
58	+	>1
59	++	0.038±0.009
60	++	0.026±0.006
61	++	0.023±0.006
62	++	0.029±0.004
63	++	0.023±0.003
64	++	0.020±0.005
65	++	0.056±0.046
66	+	>1
67	+	>1
68	+	>1

[0120]

Table 5: chymase-binding activity and chymase-inhibitory activity (IC₅₀). In the binding activity, "++" shows significant binding to chymase than SEQ ID NO: 58 which is a negative control, and "+" shows similar binding level as SEQ ID NO: 58 which is a negative control. In the inhibitory activity, ">1" shows no inhibitory activity in the concentration range up to 1 μM. IC₅₀ value is a mean value of two measurements.

[0121]

SEQ ID NO: 58 did not show an inhibitory activity in the concentration range up to 1 μM (IC₅₀>1 μM). In addition, the IC₅₀ value of chymostatin, which is a positive control, was 0.1 μM-0.2 μM. From the above results, it is clear that, among the aptamers shown in Table 5, the aptamers shown by SEQ ID NO: 59-65 have a strong chymase-inhibitory activity (IC₅₀<0.1 μM).

[0122]

20 Example 6: alteration of shortened aptamer - 1

To enhance nuclease resistance of the aptamer shown by SEQ ID NO: 56, an altered aptamer with terminal modification, an altered aptamer wherein the 2'-position of ribose of purine base in the sequence is modified with O-methyl group or F, and an altered aptamer wherein phosphorothioate is introduced were prepared. The sequences are shown by SEQ ID NO: 56(1)-56(14),

56(17)-56(19). In addition, an altered aptamer wherein modification of pyrimidine nucleotide contained in the common sequence of the aptamer shown by SEQ ID NO: 56 (2'-F; modification of the 2-position of ribose with F) is changed to native type (2'-OH) was prepared, and the necessity of
 5 modification was evaluated. The sequences thereof are shown by SEQ ID NO: 56(15), 56(16).

[0123]

The respective nucleotide sequences are shown below.

10 Unless otherwise specified, the respective sequences recited below are in the direction of from 5' to 3', modification at the 2'-position of ribose is shown in the parenthesis, F is a fluorine atom and M is an O-methyl group. In respective sequence terminals, idT shows modification with inverted-dT,
 15 and PEG shows modification with 40 kDa branched polyethylene glycol. In the sequences, s shows phosphorothioation of a phosphate group between the nucleotides.

[0124]

SEQ ID NO: 56(1):

20 (sequence wherein both terminals of the clone shown by SEQ ID NO: 56 are modified with idT)

idT-GGGU(F)U(F)AGAU(F)AGAGU(F)U(F)AAAAAC(F)C(F)C(F)-idT

SEQ ID NO: 56(2):

(sequence wherein modification is introduced into 3 positions
 25 of sequence other than the common sequence of the clone shown by SEQ ID NO: 56)

G(M)G(M)G(M)U(F)U(F)AGAU(F)AGAGU(F)U(F)AAAAAC(F)C(F)C(F)

SEQ ID NO: 56(3):

(sequence wherein modification is introduced into 2 positions
 30 of sequence other than the common sequence of the clone shown by SEQ ID NO: 56)

GGGU(F)U(F)AGAU(F)AGAGU(F)U(F)AAAA(M)A(M)C(F)C(F)C(F)

SEQ ID NO: 56(4):

(sequence wherein modification is introduced into 1 position
 35 of the common sequence of the clone shown by SEQ ID NO: 56)

GGGU(F)U(F)AGAU(F)A(M)GAGU(F)U(F)AAAAAC(F)C(F)C(F)

SEQ ID NO: 56(5):

(sequence wherein modification is introduced into 2 positions of the common sequence of the clone shown by SEQ ID NO: 56)

5 GGGU(F)U(F)AGAU(F)AGAGU(F)U(F)A(M)A(M)AAAC(F)C(F)C(F)

SEQ ID NO: 56(6):

(sequence wherein modification is introduced into 1 position of the common sequence of the clone shown by SEQ ID NO: 56)

GGGU(F)U(F)AG(M)AU(F)AGAGU(F)U(F)AAAAAC(F)C(F)C(F)

10 SEQ ID NO: 56(7):

(sequence wherein modification is introduced into 1 position of the common sequence of the clone shown by SEQ ID NO: 56)

GGGU(F)U(F)AGA(M)U(F)AGAGU(F)U(F)AAAAAC(F)C(F)C(F)

SEQ ID NO: 56(8):

15 (sequence wherein modification is introduced into 1 position of the common sequence of the clone shown by SEQ ID NO: 56)

GGGU(F)U(F)AGAU(F)AG(M)AGU(F)U(F)AAAAAC(F)C(F)C(F)

SEQ ID NO: 56(9):

(sequence wherein modification is introduced into 1 position of the common sequence of the clone shown by SEQ ID NO: 56)

20 GGGU(F)U(F)AGAU(F)AGA(M)GU(F)U(F)AAAAAC(F)C(F)C(F)

SEQ ID NO: 56(10):

(sequence wherein modification is introduced into 1 position of the common sequence of the clone shown by SEQ ID NO: 56)

25 GGGU(F)U(F)A(M)GAU(F)AGAGU(F)U(F)AAAAAC(F)C(F)C(F)

SEQ ID NO: 56(11):

(sequence wherein modification is introduced into 1 position of the common sequence of the clone shown by SEQ ID NO: 56)

GGGU(F)U(F)AGAU(F)AGAGU(F)U(F)AAA(M)AAC(F)C(F)C(F)

30 SEQ ID NO: 56(12):

(sequence wherein modification is introduced into 1 position of the common sequence of the clone shown by SEQ ID NO: 56)

GGGU(F)U(F)AGAU(F)AGAG(M)U(F)U(F)AAAAAC(F)C(F)C(F)

SEQ ID NO: 56(13):

35 (sequence wherein modification is introduced into 1 position

of the common sequence of the clone shown by SEQ ID NO: 56)

GGGU(F)U(F)AGAU(F)AG(F)AGU(F)U(F)AAAAAC(F)C(F)C(F)

SEQ ID NO: 56(14):

(sequence wherein modification is introduced into 1 position

5 of the common sequence of the clone shown by SEQ ID NO: 56)

GGGU(F)U(F)AGAU(F)AGA(F)GU(F)U(F)AAAAAC(F)C(F)C(F)

SEQ ID NO: 56(15):

(sequence wherein the 9th nucleotide U(F) of the clone shown by SEQ ID NO: 56 is substituted by U)

10 GGGU(F)U(F)AGAUAGAGU(F)U(F)AAAAAC(F)C(F)C(F)

SEQ ID NO: 56(16):

(sequence wherein the 15th nucleotide U(F) of the clone shown by SEQ ID NO: 56 is substituted by U)

GGGU(F)U(F)AGAU(F)AGAGU(F)UAAAAAC(F)C(F)C(F)

15 SEQ ID NO: 56(17):

(sequence wherein the terminals of the clone shown by SEQ ID NO: 56 are modified with PEG and idT)

PEG-GGGU(F)U(F)AGAU(F)AGAGU(F)U(F)AAAAAC(F)C(F)C(F)-idT

SEQ ID NO: 56(18):

20 (sequence wherein one phosphate group in the common sequence of the clone shown by SEQ ID NO: 56 is phosphorothioated)

GGGU(F)U(F)sAGAU(F)AGAGU(F)U(F)AAAAAC(F)C(F)C(F)

SEQ ID NO: 56(19):

(sequence wherein one phosphate group in the common sequence 25 of the clone shown by SEQ ID NO: 56 is phosphorothioated)

GGGU(F)U(F)AsGAU(F)AGAGU(F)U(F)AAAAAC(F)C(F)C(F)

[0125]

All nucleic acids of SEQ ID NO: 56(1)-56(19) were prepared by chemical synthesis. Whether these nucleic acids 30 are bound to chymase was assessed by surface plasmon resonance method in the same manner as in Example 4. The measurement results are shown in Table 6.

As a result, nucleic acids other than SEQ ID NO: 56(8), 56(10), 56(13), 56(14) showed a significant chymase-binding 35 activity than SEQ ID NO: 58, which is a negative control.

[0126]

The inhibitory activity on chymase was measured in the same manner as in Example 3. The IC_{50} values are shown in Table 6. It was found that the nucleic acids other than SEQ ID NO: 56(8), 56(10), 56(13), 56(14) showed an inhibitory activity, though the level of inhibitory activity varied. By comparison of the IC_{50} values, the inhibitory activity of SEQ ID NO: 56(1)-56(7), 56(11), 56(12) was maintained almost at the same level as SEQ ID NO: 56. On the other hand, the inhibitory activity of SEQ ID NO: 56(9), 56(15), 56(16), 56(17) was decreased as compared to SEQ ID NO: 56, and the inhibitory activity of SEQ ID NO: 56(8), 56(10), 56(13), 56(14) was shown to have disappeared. Furthermore, the inhibitory activity of SEQ ID NO: 56(18), 56(19) was shown to have increased than SEQ ID NO: 56.

From the results of SEQ ID NO: 56(1), 56(17), it was found that an influence of the modification of the terminal on the activity was small. From the results of SEQ ID NO: 56(2), 56(3), it was shown that the modification of the stem sequence did not influence the activity. As to the nucleotides contained in the common sequence, the modification permitted maintenance of the inhibitory activity in 56(4)-56(7), 56(11), 56(12), and decreased (or eliminated) the inhibitory activity in SEQ ID NO: 56(8), 56(9), 56(10), 56(13), 56(14).

[0127]

From the above, it was found that at least one nucleotide of the aptamer shown by SEQ ID NO: 56 may be modified to increase the stability of the aptamer. As the modification of nucleotide, for example, 2'-amino modification and the like can be mentioned in addition to 2'-O-methyl modification.

On the other hand, from the results of SEQ ID NO: 56(15), 56(16), it was found that the inhibitory activity decreases by changing any (9th or 15th) of the nucleotide modified aptamers (U(F)) contained in the common sequence of the clone shown by SEQ ID NO: 56 to native ribonucleotide (U). In general, the

modification of nucleotide increases nuclease resistance of aptamer. Therefore, at least one of the pyrimidine nucleotides (9th U and 15th U of the clone shown by SEQ ID NO: 56) contained in the common sequence is preferably a modified
5 nucleotide.

Moreover, from the results of SEQ ID NO: 56(8), 56(9), 56(10), 56(13), 56(14), at least one of the 6th A, 11th G and 12th A of the native purine bases contained in the common sequence of the clone shown by SEQ ID NO: 56 is preferably a
10 native ribonucleotide, since introduction of modification thereinto decreases the inhibitory activity.

Furthermore, from the results of SEQ ID NO: 56(18), 56(19), it was found that the inhibitory activity increases by introduction of phosphorothioate into at least one position as
15 a modification of a phosphate group, in addition to the modification of a sugar residue.

[0128]

[Table 6]

SEQ ID NO:	binding activity using Biacore	IC ₅₀ [μM]
56	++	0.027±0.002
56(1)	++	0.026±0.007
56(2)	++	0.024±0.003
56(3)	++	0.025±0.002
56(4)	++	0.027±0.005
56(5)	++	0.029±0.001
56(6)	++	0.031±0.001
56(7)	++	0.038±0.001
56(8)	+	>1
56(9)	++	0.111±0.003
56(10)	+	>1
56(11)	++	0.028±0.003
56(12)	++	0.035±0.003
56(13)	+	>1
56(14)	+	>1
56(15)	++	0.061±0.014
56(16)	++	0.058±0.002
56(17)	n.d.	0.058±0.000
56(18)	++	0.012±0.001
56(19)	++	0.008±0.001

[0129]

Table 6: chymase-binding activity and chymase-inhibitory activity (IC_{50}). In the binding activity, "++" shows significant binding to chymase than SEQ ID NO: 58 which is a negative control, and "+" shows similar binding level as SEQ ID NO: 58 which is a negative control. "n.d." shows not determined. ">1" shows no inhibitory activity in the concentration range up to 1 μM . IC_{50} value is a mean value of two measurements.

10 [0130]

SEQ ID NO: 58, which is a negative control, did not show an inhibitory activity in the concentration range up to 1 μM ($IC_{50} > 1 \mu M$). In addition, the IC_{50} value of chymostatin, which is a positive control, was 0.1 μM -0.2 μM .

15 [0131]

From the above results, among the nucleic acids shown in Table 6, particularly one showing an IC_{50} value of 0.1 μM or below had a strong chymase-inhibitory activity and was suggested to be usable as a chymase inhibitor.

20 [0132]

Example 7: alteration of shortened aptamer - 2

The aptamer shown by SEQ ID NO: 56 was altered further based on the results of Example 6. Altered aptamers subjected to introduction of 2'-O-methyl group, various terminal
25 modifications, introduction of phosphorothioate, substitution of ribonucleotide to DNA and the like, and a combination of such modifications were synthesized. The sequences are shown in SEQ ID NO: 56(20)-56(47), 61(1), 69, 69(1), 69(2), 70-74, 74(1), 75-77, 77(1), 77(2), 78-82.

30 [0133]

The respective nucleotide sequences are shown below. Unless otherwise specified, the respective sequences recited below are in the direction of from 5' to 3', upper case letters show RNA and lower case letters show DNA. The
35 modification at the 2'-position of ribose is shown in

parenthesis, F is a fluorine atom and M is an O-methyl group. In respective sequence terminals, idT shows modification with inverted-dT, PEG shows modification with 40 kDa branched polyethylene glycol, Cho shows modification with cholesterol and B shows modification with biotin. Peptide 1 shows conjugation of Phe-Cys at the C-terminal side, Peptide 2 shows conjugation of Cys-Phe at the N-terminal side, and each peptide is conjugated to the 5' end of the nucleic acid via a disulfide bond. In the sequences, s shows phosphorothioation of a phosphate group between the nucleotides.

[0134]

SEQ ID NO: 56(20):

G(M)G(M)G(M)U(F)U(F)AG(M)A(M)U(F)A(M)GAGU(F)U(F)A(M)A(M)AA(M)A(M)C(F)C(F)C(F)

15 SEQ ID NO: 56(21):

G(M)G(M)G(M)U(F)U(F)AG(M)A(M)U(F)A(M)GAG(M)U(F)U(F)A(M)A(M)A(M)A(M)A(M)C(F)C(F)C(F)

SEQ ID NO: 56(22):

G(M)G(M)G(M)U(F)U(F)sAG(M)A(M)U(F)A(M)GAG(M)U(F)U(F)A(M)A(M)A(M)A(M)A(M)A(M)C(F)C(F)C(F)

SEQ ID NO: 56(23):

G(M)G(M)G(M)U(F)U(F)AsG(M)A(M)U(F)A(M)GAG(M)U(F)U(F)A(M)A(M)A(M)A(M)A(M)A(M)C(F)C(F)C(F)

SEQ ID NO: 56(24):

25 idT-

G(M)G(M)G(M)U(F)U(F)AGAU(F)AGAGU(F)U(F)AAAA(M)A(M)C(F)C(F)C(F)-idT

SEQ ID NO: 56(25):

idT-GGGU(F)U(F)AG(M)A(M)U(F)A(M)GAGU(F)U(F)AAAAAC(F)C(F)C(F)-

30 idT

SEQ ID NO: 56(26):

idT-

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

35 SEQ ID NO: 56(27):

PEG-

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

SEQ ID NO: 56(28):

5 idT-

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

SEQ ID NO: 56(29):

idT-

10 G(M)G(M)G(M)U(F)U(F)sAsG(M)A(M)U(F)A(M)GAG(M)U(F)U(F)A(M)A(M)A(M)
(M)A(M)A(M)C(F)C(F)C(F)-idT

SEQ ID NO: 56(30):

idT-

G(M)G(M)G(M)U(F)U(F)AGA(M)U(F)A(M)GAG(M)U(F)U(F)A(M)A(M)A(M)A(M)
15 M)A(M)C(F)C(F)C(F)-idT

SEQ ID NO: 56(31):

idT-

G(M)G(M)G(M)U(F)U(F)AG(M)AU(F)A(M)GAG(M)U(F)U(F)A(M)A(M)A(M)A(M)
)A(M)C(F)C(F)C(F)-idT

20 SEQ ID NO: 56(32):

idT-

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

SEQ ID NO: 56(33):

25 idT-

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

SEQ ID NO: 56(34):

idT-

30 G(M)G(M)G(M)U(F)U(F)AsG(M)AU(F)A(M)GAG(M)U(F)U(F)A(M)A(M)A(M)A(M)
(M)A(M)C(F)C(F)C(F)-idT

SEQ ID NO: 56(35):

idT-

G(M)G(M)G(M)U(F)U(F)AsGAU(F)A(M)GAG(M)U(F)U(F)A(M)A(M)A(M)A(M)
35 A(M)C(F)C(F)C(F)-idT

SEQ ID NO: 56(36):

idT-

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

5 SEQ ID NO: 56(37):

idT-

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

SEQ ID NO: 56(38):

10 idT-

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

SEQ ID NO: 56(39):

PEG-

15 GG(M)G(M)U(F)U(F)AG(M)A(M)U(F)A(M)GAG(M)U(F)U(F)A(M)A(M)A(M)A(M)
M)A(M)C(F)C(F)C(F)-idT

SEQ ID NO: 56(40):

idT-

GG(M)G(M)U(F)U(F)AG(M)A(M)U(F)A(M)GAG(M)U(F)U(F)A(M)A(M)A(M)A(M)
20 M)A(M)C(F)C(F)C(F)-idT

SEQ ID NO: 56(41):

idT-

GG(M)G(M)U(F)U(F)AsG(M)A(M)U(F)A(M)GAG(M)U(F)U(F)A(M)A(M)A(M)A(M)
(M)A(M)C(F)C(F)C(F)-idT

25 SEQ ID NO: 56(42):

Cho-

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

SEQ ID NO: 56(43):

30 Peptide 1-

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

SEQ ID NO: 56(44):

Peptide 2-

35 G(M)G(M)G(M)U(F)U(F)AG(M)A(M)U(F)A(M)GAG(M)U(F)U(F)A(M)A(M)A(M)

)A(M)A(M)C(F)C(F)C(F)-idT
 SEQ ID NO: 56(45):
 idT-
 G(M)G(M)G(M)U(F)U(F)AG(M)A(M)U(F)A(M)GAG(M)U(F)U(F)A(M)A(M)A(M)
 5)A(M)A(M)C(F)C(F)C(F)-PEG
 SEQ ID NO: 56(46):
 B-idT-
 G(M)G(M)G(M)U(F)U(F)AG(M)A(M)U(F)A(M)GAG(M)U(F)U(F)A(M)A(M)A(M)
)A(M)A(M)C(F)C(F)C(F)-idT
 10 SEQ ID NO: 56(47):
 idT-
 G(M)G(M)G(M)U(F)U(F)AG(M)A(M)U(F)A(M)GAG(M)U(F)U(F)A(M)A(M)A(M)
)A(M)A(M)C(F)C(F)C(F)-idT-B
 SEQ ID NO: 56(48):
 15 idT-
 G(M)G(M)G(M)U(F)U(F)AG(M)A(M)U(F)A(M)GAG(M)U(F)U(F)A(M)A(M)A(M)
)A(M)A(M)ccc-idT
 SEQ ID NO: 56(49):
 idT-
 20 G(M)G(M)G(M)U(F)U(F)aG(M)AU(F)A(M)GAG(M)U(F)U(F)A(M)A(M)A(M)A(M)
)A(M)C(F)C(F)C(F)-idT
 SEQ ID NO: 56(50):
 idT-
 G(M)G(M)G(M)U(F)U(F)AG(M)aU(F)A(M)GAG(M)U(F)U(F)A(M)A(M)A(M)A(M)
 25 M)A(M)C(F)C(F)C(F)-idT
 SEQ ID NO: 56(51):
 B-idT-
 G(M)G(M)G(M)U(F)U(F)AG(M)aU(F)A(M)GAG(M)U(F)U(F)A(M)A(M)A(M)A(M)
)A(M)C(F)C(F)C(F)-idT
 30 SEQ ID NO: 56(52):
 idT-
 G(M)G(M)G(M)U(F)U(F)AgaU(F)A(M)GAG(M)U(F)U(F)A(M)A(M)A(M)A(M)A(M)
)C(F)C(F)C(F)-idT
 SEQ ID NO: 61(1):
 35 G(M)G(M)G(M)U(F)U(F)AG(M)A(M)U(F)A(M)GAU(F)U(F)U(F)A(M)A(M)A(M)

) A (M) A (M) C (F) C (F) C (F)

SEQ ID NO: 69:

PEG-

A (M) A (M) A (M) G (M) G (M) G (M) U (F) U (F) A G (M) A (M) U (F) A (M) G A G (M) U (F) U (F)

5) A (M) A (M) A (M) A (M) A (M) C (F) C (F) C (F) -idT

SEQ ID NO: 69(1):

idT-

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

10 SEQ ID NO: 69(2):

idT-

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

SEQ ID NO: 70:

15 idT-

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

SEQ ID NO: 71:

idT-

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

SEQ ID NO: 72:

idT-

G (M) G (M) G (M) t t A G (M) A (M) U (F) A (M) G A G (M) t U (F) A (M) A (M) A (M) A (M) A (M)

25 ccc-idT

SEQ ID NO: 72(1):

idT-

G (M) G (M) G (M) t t A G (M) a U (F) A (M) G A G (M) t U (F) A (M) A (M) A (M) A (M) A (M) ccc
-idT

30 SEQ ID NO: 72(2):

idT-

G (M) G (M) G (M) t t A s G (M) a U (F) A (M) G A G (M) t U (F) A (M) A (M) A (M) A (M) A (M) cc
c-idT

SEQ ID NO: 72(3):

35 idT-

G(M)G(M)G(M)ttAG(M)A(M)U(F)A(M)GAgtU(F)A(M)A(M)A(M)A(M)A(M)ccc
-idT

SEQ ID NO: 72(4):

idT-

5 G(M)G(M)G(M)ttAG(M)A(M)U(F)A(M)GAG(M)tU(F)aA(M)A(M)A(M)A(M)ccc
-idT

SEQ ID NO: 72(5):

idT-

G(M)G(M)G(M)ttAG(M)A(M)U(F)A(M)GAG(M)tU(F)A(M)aA(M)A(M)A(M)ccc
10 -idT

SEQ ID NO: 72(6):

idT-

G(M)G(M)G(M)ttAG(M)A(M)U(F)A(M)GAG(M)tU(F)A(M)A(M)aA(M)A(M)ccc
-idT

15 SEQ ID NO: 72(7):

idT-

G(M)G(M)G(M)ttAG(M)aU(F)A(M)GAG(M)tU(F)A(M)A(M)A(M)A(M)A(M)ccc
-PEG

SEQ ID NO: 72(8):

20 B-idT-

G(M)G(M)G(M)ttAG(M)aU(F)A(M)GAG(M)tU(F)A(M)A(M)A(M)A(M)A(M)ccc
-idT

[0135]

All nucleic acids of SEQ ID NO: 56(20)-56(52), 61(1), 69,
25 69(1), 69(2), 70-72, 72(1)-72(8) were prepared by chemical
synthesis. Whether these nucleic acids are bound to chymase
was assessed by surface plasmon resonance method in the same
manner as in Example 4. The results are shown in Table 7.

As a result, all nucleic acids (excluding undetermined
30 nucleic acids) were significantly bound to chymase than the
negative control.

The chymase inhibitory activity was measured in the same
manner as in Example 3. The IC₅₀ values are shown in Table 7.
As a result, all nucleic acids shown in Table 7 exhibited a
35 strong inhibitory activity.

From the results of SEQ ID NO: 56(27) and 56(45), it was shown that a terminal modification such as PEG may be introduced at any of the 5' end and the 3' end.

From the results of SEQ ID NO: 56(43), 56(44), 56(46) and 56(47), moreover, it was found that the terminal modification may be peptide, amino acid or a compound such as biotin and the like, besides idT and PEG shown in Example 6.

From the results of SEQ ID NO: 56(26) and 69(2), 56(27) and 69, and 56(28) and 69(1), moreover, it was found that terminal modification such as idT and PEG via a polynucleotide chain does not influence the inhibitory activity. As such spacer, any polynucleotide chain and, for example, an alkyl type spacer may be used.

It was also found that the inhibitory activity increases by substituting a part of F-form to a DNA-form.

[0136]

[Table 7]

SEQ ID NO:	binding activity using Biacore	IC ₅₀ [μM]	SEQ ID NO:	binding activity using Biacore	IC ₅₀ [μM]
56(20)	++	0.102±0.009	56(44)	++	0.042±0.007
56(21)	++	0.045±0.006	56(45)	n.d.	0.059±0.006
56(22)	++	0.052±0.002	56(46)	++	0.049±0.002
56(23)	++	0.032±0.003	56(47)	++	0.037±0.006
56(24)	++	0.038±0.003	56(48)	++	0.036±0.003
56(25)	++	0.070±0.009	56(49)	++	0.069±0.000
56(26)	++	0.054±0.002	56(50)	++	0.027±0.002
56(27)	n.d.	0.084±0.006	56(51)	++	0.029±0.003
56(28)	++	0.044±0.002	56(52)	++	0.052±0.001
56(29)	++	0.036±0.003	61(1)	++	0.078±0.004
56(30)	++	0.034±0.003	69	n.d.	0.091±0.019
56(31)	++	0.023±0.001	69(1)	++	0.044±0.002
56(32)	++	0.017±0.000	69(2)	++	0.048±0.002
56(33)	++	0.035±0.002	70	++	0.027±0.004
56(34)	++	0.031±0.006	71	++	0.028±0.005
56(35)	++	0.024±0.005	72	++	0.020±0.002
56(36)	++	0.097±0.017	72(1)	++	0.013±0.003
56(37)	++	0.046±0.007	72(2)	++	0.014±0.002
56(38)	++	0.019±0.005	72(3)	++	0.050±0.004
56(39)	n.d.	0.086±0.018	72(4)	++	0.065±0.002
56(40)	++	0.051±0.001	72(5)	++	0.027±0.002

56(41)	++	0.053±0.013	72(6)	++	0.041±0.002
56(42)	++	0.071±0.001	72(7)	n.d.	0.055±0.002
56(43)	++	0.035±0.003	72(8)	n.d.	0.018±0.001

[0137]

Table 7: chymase-binding activity and chymase-inhibitory activity (IC_{50}). In the binding activity, "++" shows significant binding to chymase than SEQ ID NO: 58 which is a negative control. "n.d." shows not determined. IC_{50} value is a mean value of two measurements.

[0138]

SEQ ID NO: 58, which is a negative control, did not show an inhibitory activity in the concentration range up to 1 μM ($IC_{50} > 1 \mu M$). In addition, the IC_{50} value of chymostatin, which is a positive control, was 0.1 μM -0.2 μM .

[0139]

From the above results, all nucleic acids shown in Table 7 had a strong chymase-inhibitory activity and are suggested to be usable as a chymase inhibitor.

[0140]

Summarizing the results of Examples 1 to 7 above, an aptamer effective as a chymase inhibitor satisfies particularly at least one of the following conditions.

- (1) It contains the common sequence ($X_1GAUAGAN_1N_2UAAX_2$) shown by SEQ ID NO: 21.
- (2) While the pyrimidine nucleotide contained in the common sequence may be a native nucleotide, a part of the pyrimidine nucleotide is preferably a modified nucleotide or DNA.
- (3) While N_1N_2 may be any nucleotide, it is preferably GU, GA, GC, UU, CU or GT.
- (4) While X_1 and X_2 may be any nucleotides, they are preferably, whether identical or not, A or G, more preferably are both A or both G.
- (5) While the base pairs sequence in the stem structure (e.g., SEQ ID NO: 56 in Fig. 6) may be any nucleotide as long as the stem structure is maintained, its length is preferably 3 base pairs or longer.

(6) Except for a part of nucleotides (6th A, 11th G and 12th A of SEQ ID NO: 56), each nucleotide is partially modified or partially substituted by DNA.

(7) A terminal modification is introduced.

5 (8) A part of a phosphate group between nucleotides may be phosphorothioated.

[0141]

Example 8: Measurement of chymase inhibitory activity using angiotensin I as substrate

10 For further assessment of the inhibitory activity of the nucleic acid of the present invention, the enzyme activity of chymase was measured using angiotensin I, which is a native substrate for chymase, according to the following method. Angiotensin I is converted by chymase to angiotensin II,
15 during which a peptide fragment His-Leu is released. Since the peptide His-Leu is fluorescently derivatized by o-phthalaldehyde, its fluorescence intensity can be quantitatively measured.

The total volume of solution for an enzyme reaction in
20 the assay was set to 50 μ L, and the reaction was performed in solution C buffer. First, 0.3-0.75 ng of chymase (recombinant, (manufactured by SIGMA) or native (manufactured by Calbiochem)) was diluted with solution C to give 5 μ L thereof. Here, the recombinant is chymase expressed by yeast, and the
25 native is chymase purified from human skin mast cell. The nucleic acid was serially diluted with solution C at a concentration of 0.0027-2 μ M to give 25 μ L thereof. The chymase solution (5 μ L) and the nucleic acid solution (25 μ L) were mixed, and the mixture was incubated at 37°C for 5 min.
30 On the other hand, 125 mM angiotensin I (manufactured by PEPTIDE INSTITUTE, INC.) was prepared in solution C to give 20 μ L thereof, which was incubated at 37°C for 5 min. The angiotensin I solution was added to a mixture of chymase and nucleic acid to start an enzyme reaction. The final chymase
35 concentration of the reaction solution was 0.2-0.5 nM, and the

final substrate concentration was 50 μ M. After reaction at 37°C for 90 min, ice-cooled 30% trichloroacetic acid solution (25 μ L) was added to quench the reaction. The whole mixture was centrifuged at 4°C, 14000 rpm for 10 min, and the supernatant (30 μ L) was used for the next fluorescence induction reaction.

The above-mentioned supernatant (30 μ L) was added to a 96 well plate (black, manufactured by Costar), a solution (15 μ L) of 2% o-phthalaldehyde (manufactured by SIGMA) in methanol and 0.3M NaOH solution (170 μ L) were added to each well, and the mixture was incubated at room temperature for 10 min. Then, 3M HCl solution (25 μ L) was added to quench the reaction. The plate was set on a microplate reader SpectraMax190 (manufactured by Molecular device) and the fluorescence intensity was measured at an excitation wavelength of 355 nm and a fluorescence wavelength of 460 nm.

[0142]

Using SEQ ID NO: 58 as a control (negative control) and chymostatin, which is a known chymotrypsin-like serine protease inhibitor (positive control), a similar treatment and measurement were performed. The fluorescence intensity at reaction time 0 min under each condition was used as a blank. The fluorescence intensity detected by the addition of the same amount of solution C instead of the nucleic acid in the chymase enzyme reaction was taken as 100%, and the inhibitory rate of each test substance was calculated by the following formula.

Inhibitory rate (%) = $[1 - \{(\text{fluorescence intensity with test substance} - \text{fluorescence intensity of blank with test substance}) / (\text{fluorescence intensity without test substance} - \text{fluorescence intensity of blank without test substance})\}] \times 100$

[0143]

The concentration of the inhibitor necessary for 50% inhibition of the enzyme activity (IC_{50}) was determined. The results are shown in Table 8.

[0144]

[Table 8]

SEQ ID NO:	IC ₅₀ [μM] for native chymase	IC ₅₀ [μM] for recombinant chymase	SEQ ID NO:	IC ₅₀ [μM] for native chymase	IC ₅₀ [μM] for recombinant chymase
4	0.031	0.003	56(34)	0.162	0.057
13	0.074	0.041	56(35)	0.120	0.039
14	0.063	0.022	56(42)	0.601	0.687
53	0.764	0.446	56(43)	0.591	0.328
54	0.614	0.397	56(44)	0.643	0.414
55	0.606	0.354	56(45)	0.303	0.377
56	0.508	0.235	56(46)	0.742	0.426
65	0.878	0.274	56(47)	0.542	0.419
56(1)	0.404	0.207	56(48)	0.621	0.394
56(17)	0.613	0.456	56(50)	0.325	0.153
56(18)	0.174	0.108	56(51)	0.429	0.310
56(19)	0.130	0.055	69	>1	0.628
56(21)	0.722	0.361	69(1)	0.480	0.125
56(22)	0.563	0.237	69(2)	0.752	0.289
56(23)	0.360	0.119	70	0.478	0.239
56(26)	0.743	0.326	71	0.341	0.161
56(27)	>1	0.724	72	0.120	0.065
56(28)	0.410	0.137	72(1)	0.103	0.036
56(29)	0.366	0.080	72(2)	0.076	0.037
56(30)	0.521	0.210	72(5)	0.377	0.201
56(31)	0.266	0.089	72(6)	0.573	0.370
56(32)	0.185	0.078	72(7)	0.312	0.158
56(33)	0.291	0.085	72(8)	0.097	0.043

[0145]

Table 8: chymase inhibitory activity (IC₅₀) using angiotensin I
5 as substrate. IC₅₀ is the value of one measurement.

[0146]

SEQ ID NO: 58 used as a negative control did not show an
inhibitory activity (IC₅₀>1 μM). The IC₅₀ values of chymostatin,
a positive control, were 0.35-0.5 μM (Native), 0.45-0.6 μM
10 (Recombinant). The activity of PEG-conjugated aptamer is
relatively low as compared to aptamer not bound with PEG. This
is a general phenomenon caused by the larger size of PEG
(molecular weight about 40,000) than aptamer (molecular weight
about 10,000). Since PEG-conjugation markedly improves in vivo
15 pharmacokinetics, an in vivo effect is expected even if

efficacy decreases somewhat in vitro.

[0147]

From the above results, any nucleic acid contained in Table 8 is expected as a drug for the prophylaxis and/or
5 treatment of various diseases involving angiotensin, since it shows a strong chymase inhibitory activity even when angiotensin I, a native substrate, is used.

[0148]

Example 9: Measurement of LTBP-1 degradation inhibitory
10 activity using normal human lung fibroblast (Normal Human Lung Fibroblast: NHLF)

Chymase is deeply involved in the activation of TGF- β , which is one of the important factors causing fibrosis. It is suggested that, in the process of TGF- β activation, chymase
15 degrades LTBP-1 to liberate latent TGF- β , which is present as a latent form in an extracellular matrix, and is involved in the reaction converting latent TGF- β to active TGF- β . Whether the nucleic acid of the present invention has an inhibitory activity against LTBP-1 degradation by chymase was assessed by
20 the method shown below.

Cryopreserved NHLF cells (manufactured by Cambrex Bio Science) were rapidly thawed in a water bath at 37°C and suspended in a medium (10% FBS/F-12). After centrifugation (1200 rpm, 5 min), the supernatant was removed and the cells
25 were re-suspended in the medium. The medium was added to a total amount of 10 mL, and the mixture was transferred to a petri dish for cell culture and the cells were cultured at 37°C, 5% CO₂. The cell form and growth state were observed with a microscope and, upon confluence, the medium was exchanged with
30 a serum-free medium (0.2% BSA/F-12). Two days after medium exchange, the culture supernatant was collected, dispensed and cryopreserved at -30°C.

The NHLF culture supernatant (40 μ L) thawed when in use was dispensed to a tube, a nucleic acid solution obtained by
35 diluting with solution C to 50 μ M was added by 5 μ L. As a

positive control, chymostatin was diluted with solution C and added in the same manner. As a negative control, only solution C was used and added in the same manner. Then, chymase diluted with solution E (solution C+0.1% BSA, 0.05% sodium azide) to
5 100 ng/mL was added by 5 μ L. The final concentration of chymase in the reaction solution was 10 ng/mL (0.33 nM), and the final nucleic acid concentration was 5 μ M. As a control, a tube free of chymase was prepared. After pipetting, samples were incubated at 37°C for 1 hr, and mixed with an equivalent
10 amount of electrophoresis Lysis buffer to terminate the reaction. Then, LTBP-1 in the sample was detected by Western blotting shown below.

A sample obtained by mixing with a lysis buffer was boiled for 3 min, 10 μ L of the sample was electrophoresed by
15 applying the sample to 5-20% acrylamide gel. After completion of the migration, the mixture was transferred onto a nitrocellulose filter, and the filter was blocked with 5% skim milk, 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) and 0.05% sodium azide. The filter was reacted with an anti-LTBP-1 monoclonal antibody
20 diluted with 2% BSA, PBS and 0.05% sodium azide to 2 μ g/mL at room temperature overnight. The filter was washed 3 times, and incubated with a secondary antibody solution (HRP-labeled anti-mouse IgG antibody diluted 10000-fold with 0.1% BSA/PBS) at room temperature for 2 hr. The filter was washed 5 times,
25 and detected with a chemical luminescence substrate.

The presence or absence of an inhibitory activity of each test substance was determined based on the density and position of LTBP-1 band (molecular weight). The analysis was demonstrated in three independent experiments. The band of a
30 well without addition of chymase was taken as a positive control (+), the band of the well of the negative control was taken as negative (-), and the presence or absence of an inhibitory activity of each test substance was visually determined from the band of the well of each test substance.
35 The analysis results by Western blotting are shown in Fig. 8,

and the determination results of the inhibitory activity are shown in Table 9.

[0149]

[Table 9]

SEQ ID NO:	lane No. in Fig. 8	inhibitory activity
56	4, 10, 16, 24	+
56(1)	2	+
56(17)	12	+
56(19)	14	+
56(23)	15	+
56(26)	13, 25	+
56(27)	11	+
56(28)	17	+
56(29)	19	+
58	3, 27	-
69(1)	18	+
72(1)	26	+
Others	lane No. in Fig. 8	inhibitory activity
marker	1, 8, 9, 23, 31	
Chymostatin	5, 20, 28	+
negative control	6, 21, 29	-
control (without addition of chymase)	7, 22, 30	+

5

[0150]

Table 9: The presence or absence of inhibitory activity on LTBP-1 degradation. "+" shows detection of a band with the same level of density as an LTBP-1 band in the control, and
 10 "-" shows absence of detection of LTBP-1 band as clear as that of the negative control.

[0151]

SEQ ID NO: 58 did not show an inhibitory activity (-). Chymostatin, a positive control, showed an inhibitory activity
 15 (+). All aptamers other than SEQ ID NO: 58, which are contained in Table 9, showed an inhibitory activity against LTBP-1 degradation.

From the above results, it was found that the aptamer of the present invention inhibits LTBP-1 degradation by chymase.
 20 Therefore, it was shown that the aptamer can be used for the

prophylaxis and/or treatment of various diseases involving activation of TGF- β , such as fibrosis.

[Industrial Applicability]

[0152]

5 The aptamer and the complex of the present invention can be useful as pharmaceuticals, diagnostic agents or reagents for diseases such as cardiovascular diseases, fibrosis and the like. The aptamer and the complex of the present invention can also be useful for the purification and concentration of
10 chymase, as well as detection and quantification of chymase.

[0153]

 This application is based on Japanese patent application No. 2009-140585, and the contents of which are incorporated hereinto by reference.

CLAIMS

1. An aptamer that binds to chymase to inhibit a chymase activity.
- 5 2. The aptamer according to claim 1, comprising a nucleotide sequence represented by $X_1GAUAGAN_1N_2UAAX_2$ (SEQ ID NO: 21; each of X_1 and X_2 , whether identical or not, is A or G, and each of N_1 and N_2 , whether identical or not, is A, G, C, U or T).
- 10 3. The aptamer according to claim 2, wherein N_1N_2 is GA, GU, GC, UU, GT or CU.
4. The aptamer according to claim 2 wherein X_1 and X_2 are both
15 A or both G.
5. The aptamer according to claim 3 or 4, wherein at least one of the pyrimidine nucleotides has been modified or altered.
- 20 6. The aptamer according to claim 1, comprising any one of the nucleotide sequences (a), (b) and (c) below:
 - (a) an aptamer comprising a nucleotide sequence selected from among SEQ ID NO: 4-34, 38-57, 59-65 and 69-72 (with the provision that the uracil may be thymine);
 - 25 (b) an aptamer comprising a nucleotide sequence selected from among SEQ ID NO: 4-34, 38-57, 59-65 and 69-72 (with the provision that the uracil may be thymine), wherein 1 to 5 nucleotides are substituted, deleted, inserted or added; and
 - (c) a nucleotide sequence having an identity of 70% or more to
30 a nucleotide sequence selected from among SEQ ID NO: 4-34, 38-57, 59-65 and 69-72 (with the provision that the uracil may be thymine).
7. The aptamer according to claim 6, wherein at least one of
35 the nucleotides contained in the aptamer has been modified or

altered.

8. The aptamer according to claim 1, comprising any one of the nucleotide sequences (a'), (b') and (c') below:

5 (a') a nucleotide sequence selected from among SEQ ID NO:

56(1)-56(7), 56(9), 56(11), 56(12), 56(15)-56(52), 61(1), 69(1), 69(2), and 72(1)-72(8) (with the provision that the uracil may be thymine);

(b') a nucleotide sequence selected from among SEQ ID NO:

10 56(1)-56(7), 56(9), 56(11), 56(12), 56(15)-56(52), 61(1), 69(1), 69(2), and 72(1)-72(8) (with the provision that the uracil may be thymine), wherein 1 to 5 nucleotides are substituted, deleted, inserted or added; and

(c') a nucleotide sequence having an identity of 70% or more
15 to a nucleotide sequence selected from among SEQ ID NO: 56(1)-56(7), 56(9), 56(11), 56(12), 56(15)-56(52), 61(1), 69(1), 69(2), and 72(1)-72(8) (with the provision that the uracil may be thymine).

20 9. The aptamer according to claim 1, wherein each of the hydroxy groups at the 2'-positions of respective pyrimidine nucleotides contained in the aptamer, whether identical or not, may be substituted by an atom or a group selected from the group consisting of a hydrogen atom, a fluorine atom and a
25 methoxy group.

10. The aptamer according to claim 1, wherein each of the hydroxy groups at the 2'-positions of respective purine nucleotides contained in the aptamer, whether identical or not,
30 may be substituted by an atom or a group selected from the group consisting of a hydrogen atom, a fluorine atom and a methoxy group.

11. A complex comprising the aptamer according to any one of
35 claims 1 to 10 and a functional substance.

12. The complex according to claim 11, wherein the functional substance is an affinity substance, a substance for labeling, an enzyme, a drug delivery vehicle or a drug.

5

13. A pharmaceutical comprising the aptamer according to any one of claims 1 to 10 or the complex according to claim 11 or 12.

10 14. The pharmaceutical according to claim 13, which is used to prevent or treat a cardiovascular disease or fibrosis. ✓

15 15. A diagnostic reagent comprising the aptamer according to any one of claims 1 to 10 or the complex according to claim 11 or 12.

16. A chymase detection probe comprising the aptamer according to any one of claims 1 to 10 or the complex according to claim 11 or 12.

20

17. A solid phase carrier for chymase purification comprising the aptamer according to any one of claims 1 to 10 or the complex according to claim 11 or 12.

25 18. A method of detecting chymase, comprising using the aptamer according to any one of claims 1 to 10 or the complex according to claim 11 or 12.

30 19. A method of purifying chymase, comprising using the aptamer according to any one of claims 1 to 10 or the complex according to claim 11 or 12. ✓

ABSTRACT

Provided are an aptamer bound to chymase to inhibit activity of chymase; an aptamer containing a nucleotide sequence represented by $X_1GAUAGAN_1N_2UAAX_2$ wherein X_1 and X_2 are
5 the same or different and each is A or G, and N_1 and N_2 are the same or different and each is A, G, C, U or T; a complex containing the aptamer and a functional substance (e.g., affinity substance, labeling substance, enzyme, drug delivery medium, drug and the like); a pharmaceutical or a reagent
10 containing the aptamer or complex; a detection and a purification methods of chymase using the aptamer or complex and the like.

SEQUENCE LISTING

<110> Ribomic Inc.
 Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd.
 <120> Aptamer against chymase and use thereof
 <130> 091555
 <150> JP2009-140585
 <151> 2009-06-11
 <160> 72
 <170> PatentIn version 3.3
 <210> 1
 <211> 70
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> DNA template for producing aptamer to chymase
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (18)..(57)
 <223> n is a, c, g, or t
 <400> 1
 ggggcgcgtc ttctatgnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnngaa 60
 ttctaccgt 70
 <210> 2
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> primer for producing aptamer to chymase
 <400> 2
 taatacgact cactataggg acggtaggaa ttc 33
 <210> 3
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> primer for producing aptamer to chymase
 <400> 3
 ggggcgcgtc ttctatg 17
 <210> 4
 <211> 73
 <212> RNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Aptamer to chymase
 <400> 4
 gggacgguag gaauucgucc auucucacaga uagagauaaa guagaaauua acaaaacaua 60
 gaagagcggc cgc 73

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

 <220>
 <223> Aptamer to chymase

 <400> 5
 gggacgguag gaaauccac uugucuuga ggcaagaaau uguauuccga agaagcauag 60
 aagagcggcc gc 72

 <210> 6
 <211> 73
 <212> RNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Aptamer to chymase

 <400> 6
 gggacgguag gaaucuacg gucuguguga aaugaaaca cacaagaac aaagacaua 60
 gaagagcgcc cgc 73

 <210> 7
 <211> 73
 <212> RNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Aptamer to chymase

 <400> 7
 gggacgguag gaaucaccu uuccaaugu gaaagaaaca caaaagaaa ugacaucau 60
 gaagagcgcc cgc 73

 <210> 8
 <211> 73
 <212> RNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Aptamer to chymase

 <400> 8
 gggacgguag gaaucuacg gucuguguga aaugaaaca cacaagaac aauaacaua 60
 gaagagcgcc cgc 73

 <210> 9
 <211> 74
 <212> RNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Aptamer to chymase

 <400> 9
 gggacgguag gaaucccgga aaagcaaca gcuugcuaaa augauuccga aaaaacacau 60
 agaagagcgg cgc 74

 <210> 10
 <211> 73
 <212> RNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Aptamer to chymase

 <400> 10
 gggacgguag gaauuccgcc gccuaaaaaa cgacgauuu acagaaacgu caaaucacua 60
 gaagagcggc cgc 73

 <210> 11
 <211> 73
 <212> RNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Aptamer to chymase

 <400> 11
 gggacgguag gaauuccga cagaaaugu gugauuuuu ccgaacaaca aaguaacaua 60
 gaagagcggc cgc 73

 <210> 12
 <211> 73
 <212> RNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Aptamer to chymase

 <400> 12
 gggacgguag gaauuccgcg ucaacguuac auaauguua uaccagggua acuaaacaua 60
 gaagagcggc cgc 73

 <210> 13
 <211> 73
 <212> RNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Aptamer to chymase

 <400> 13
 gggacgguag gaauuccgca accaucccg uacuaugguu agauagaguu aaaaaccuaa 60
 gaagagcggc cgc 73

 <210> 14
 <211> 73
 <212> RNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Aptamer to chymase

 <400> 14
 gggacgguag gaauucucgu uccugacagc auuugagaua gauuuuaaca aacgcacaua 60
 gaagagcggc cgc 73

 <210> 15
 <211> 73
 <212> RNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Aptamer to chymase

<400> 15
gggacggguag gaaUuccag aaaUaaaU ccgaagaaa caacaUUUU ugcaaacaua 60
gaagagcggc cgc 73

<210> 16
<211> 72
<212> RNA
<213> Artificial

<220>
<223> Aptamer to chymase

<400> 16
gggacggguag gaaUuccau gacugaaaaa cgucaguaaa auccgaaaau cauaucauag 60
aagagcggcc gc 72

<210> 17
<211> 74
<212> RNA
<213> Artificial

<220>
<223> Aptamer to chymase

<400> 17
gggacggguag gaaUuccguU cgcagaaaag aacUUUUaaa aaauGuacgu gggagcacau 60
agaagagcgg ccgc 74

<210> 18
<211> 73
<212> RNA
<213> Artificial

<220>
<223> Aptamer to chymase

<400> 18
gggacggguag gaaUucgaac gacaaUUau agaacuucgu uugacauucc acaccacaua 60
gaagagcggc cgc 73

<210> 19
<211> 73
<212> RNA
<213> Artificial

<220>
<223> Aptamer to chymase

<400> 19
gggacggguag gaaUuccac ugcaauucag cagaaaaau uccgaaaaac acacaccaua 60
gaagagcggc cgc 73

<210> 20
<211> 73
<212> RNA
<213> Artificial

<220>
<223> Aptamer to chymase

<400> 20
gggacggguag gaaUucaaaa ucagcugauu uGuaUUUUU uuacacaggc aaaacacaua 60
gaagagcggc cgc 73

<210> 21
 <211> 13
 <212> RNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Consensus sequence of Aptamer to chymase

<220>
 <221> misc_feature
 <223> n is a, c, g, or t

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> n is a, c, g, or u

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (8)..(9)
 <223> n is a, c, g, or u

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (13)..(13)
 <223> n is a, c, g, or u

<400> 21
 ngauagannu aan 13

<210> 22
 <211> 73
 <212> RNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Aptamer to chymase

<400> 22
 gggacggguag gaauuccga cacaaaugu gugauuaau ccgaacaaca aaguaacaua 60
 gaagagcggc cgc 73

<210> 23
 <211> 73
 <212> RNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Aptamer to chymase

<400> 23
 gggacggguag gaauucauau guacuccguc cugacaaaau gucaaugaca aacguucaua 60
 gaagagcggc cgc 73

<210> 24
 <211> 72
 <212> RNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Aptamer to chymase

<400> 24
 gggacggguag gaauuccuu cauaguagaa uguugguuuc uacaaaagcg acaagcauag 60
 aagagcggcc gc 72

<210> 25
 <211> 73
 <212> RNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Aptamer to chymase

 <400> 25
 gggacgguag gaaauucagcu gacuccaaug cacacguaga uagaguuaaa acguugcaua 60
 gaagagcggc cgc 73

 <210> 26
 <211> 73
 <212> RNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Aptamer to chymase

 <400> 26
 gggacgguag gaaauucgucg auucucacaga uagagauaaa guagaauuuu acaaaacaua 60
 gaagagcggc cgc 73

 <210> 27
 <211> 73
 <212> RNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Aptamer to chymase

 <400> 27
 gggacgguag gaaauccguc aucggugca aaugaaaau acaaaacaag gacaaccuaa 60
 gaagagcggc cgc 73

 <210> 28
 <211> 73
 <212> RNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Aptamer to chymase

 <400> 28
 gggacgguag gaaaucaauu ucuuucuaau cucaccugag uauaucaggc acaguacaua 60
 gaagagcggc cgc 73

 <210> 29
 <211> 73
 <212> RNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Aptamer to chymase

 <400> 29
 gggacgguag gaaaucacga ccgcccaaaa aauggugaca uuuuagaaac accgaacaua 60
 gaagagcggc cgc 73

 <210> 30
 <211> 71

<212> RNA
<213> Artificial

<220>
<223> Aptamer to chymase

<400> 30
gggacggguag gaauucgucc cucuugucua uuugcagau agacuuaag caaacauaga 60
agagcgccgc c 71

<210> 31
<211> 71
<212> RNA
<213> Artificial

<220>
<223> Aptamer to chymase

<400> 31
gggacggguag gaauucgucc cucaugucua uuugcagau agacuuaag caaacauaga 60
agagcgccgc c 71

<210> 32
<211> 70
<212> RNA
<213> Artificial

<220>
<223> Aptamer to chymase

<400> 32
gggacggguag gaauucgucc ucaugucua uuugcagau gacuuaagc aaacauagaa 60
gagcgccgc 70

<210> 33
<211> 73
<212> RNA
<213> Artificial

<220>
<223> Aptamer to chymase

<400> 33
gggacggguag gaauucguu cuuuuccac gcaacaaau acagagcuu gcaaacaua 60
gaagagcggc cgc 73

<210> 34
<211> 73
<212> RNA
<213> Artificial

<220>
<223> Aptamer to chymase

<400> 34
gggacggguag gaauucgcc gcaacccau gaaaacgaag auagagaua aucgaacua 60
gaagagcggc cgc 73

<210> 35
<211> 72
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> DNA template for producing aptamer to chymase

<220>

<221> misc_feature

<222> (20)..(49)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 35

tcacactagc acgcataggn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn atctgacctc 60

tctcctgctc cc 72

<210> 36

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer for producing aptamer to chymase

<400> 36

taatacgact cactataggg agcaggagag aggtcagatg 40

<210> 37

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer for producing aptamer to chymase

<400> 37

tcacactagc acgcatagg 19

<210> 38

<211> 72

<212> RNA

<213> Artificial

<220>

<223> Aptamer to chymase

<400> 38

gggagcagga gagaggucag auggauagag uuaagaucug gcuggcgcau uagccuauugc 60

gugcuagugu ga 72

<210> 39

<211> 72

<212> RNA

<213> Artificial

<220>

<223> Aptamer to chymase

<400> 39

gggagcagga gagaggucag augguuacgg auagaguuaa gguaacggua cggccuauugc 60

gugcuagugu ga 72

<210> 40

<211> 73

<212> RNA

<213> Artificial

<220>

<223> Aptamer to chymase

<400> 40
 gggagcagga gagaggucag augaacggau agagcuaaga guucgucaga ggggccuau
 60
 cgugcuagug uga 73

<210> 41
 <211> 72
 <212> RNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Aptamer to chymase

<400> 41
 gggagcagga gagaggucag auggugagau agaguuaaac accacaauag uagccuau
 60
 gugcuagugu ga 72

<210> 42
 <211> 72
 <212> RNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Aptamer to chymase

<400> 42
 gggagcagga gagaggucag augcgugauc gugcaaggcg gauagaguua aggccuau
 60
 gugcuagugu ga 72

<210> 43
 <211> 72
 <212> RNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Aptamer to chymase

<400> 43
 gggagcagga gagaggucag augaugccaa gauagauuaa aauggcguuu gggccuau
 60
 gugcuagugu ga 72

<210> 44
 <211> 72
 <212> RNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Aptamer to chymase

<400> 44
 gggagcagga gagaggucag auguuagacc aaagcauagg agauagaguu aaaccuau
 60
 gugcuagugu ga 72

<210> 45
 <211> 72
 <212> RNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Aptamer to chymase

<400> 45
 gggagcagga gagaggucag auggaccacc gaugggcaag auagaguuaa augccuau
 60
 gugcuagugu ga 72

<210> 46
 <211> 72
 <212> RNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Aptamer to chymase

 <400> 46
 gggagcagga gagaggucag augggacaga uagaguuaa guccguuacg uggccuauugc 60
 gugcuagugu ga 72

 <210> 47
 <211> 72
 <212> RNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Aptamer to chymase

 <400> 47
 gggagcagga gagaggucag auggugauag auagaguuaa aaucgcugaa uggccuauugc 60
 gugcuagugu ga 72

 <210> 48
 <211> 72
 <212> RNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Aptamer to chymase

 <400> 48
 gggagcagga gagaggucag augugaagau agagauaaau cacauacagu cggccuauugc 60
 gugcuagugu ga 72

 <210> 49
 <211> 29
 <212> RNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Aptamer to chymase

 <400> 49
 gguucucacag auagagauaa aguagaacc 29

 <210> 50
 <211> 35
 <212> RNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Aptamer to chymase

 <400> 50
 ggcauucucac agauagagau aaaguagaau uuaac 35

 <210> 51
 <211> 45
 <212> RNA
 <213> Artificial

 <220>

<223> Aptamer to chymase

<400> 51

cguuacauaa uguauauacc aggguaacua aacauagaag agcgg

45

<210> 52

<211> 26

<212> RNA

<213> Artificial

<220>

<223> Aptamer to chymase

<400> 52

ccguauauac caggguaacu aaacgg

26

<210> 53

<211> 42

<212> RNA

<213> Artificial

<220>

<223> Aptamer to chymase

<400> 53

ggguaacuau gguuagauag aguuaaaaac cauagaagac cc

42

<210> 54

<211> 36

<212> RNA

<213> Artificial

<220>

<223> Aptamer to chymase

<400> 54

uaacuauuggu uagauagagu uaaaaaccu agaaga

36

<210> 55

<211> 29

<212> RNA

<213> Artificial

<220>

<223> Aptamer to chymase

<400> 55

cuaugguuag auagaguuaa aaaccuag

29

<210> 56

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial

<220>

<223> Aptamer against chymase

<400> 56

ggguuagaua gaguaaaaa ccc

23

<210> 57

<211> 27

<212> RNA

<213> Artificial

<220>

<223> Aptamer against chymase

<400> 57 gcuuugaga uaguuuaaa caaacgc	27
<210> 58 <211> 23 <212> RNA <213> Artificial	
<220> <223> Aptamer against chymase	
<400> 58 gguuugaaga uauuaagaa ccc	23
<210> 59 <211> 23 <212> RNA <213> Artificial	
<220> <223> Aptamer against chymase	
<400> 59 gguuagaua gaguaaaaa ccc	23
<210> 60 <211> 23 <212> RNA <213> Artificial	
<220> <223> Aptamer against chymase	
<400> 60 gguuagaua gaguaaaaa ccc	23
<210> 61 <211> 23 <212> RNA <213> Artificial	
<220> <223> Aptamer against chymase	
<400> 61 gguuagaua guuuuaaaa ccc	23
<210> 62 <211> 23 <212> RNA <213> Artificial	
<220> <223> Aptamer against chymase	
<400> 62 gguuaggaua gaguaagaa ccc	23
<210> 63 <211> 23 <212> RNA <213> Artificial	
<220> <223> Aptamer against chymase	
<400> 63 gcuacagaua gaguaaagu agc	23

<210> 64
 <211> 23
 <212> RNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Aptamer against chymase

<400> 64
 gucacagaua gaguuaaagu gac 23

<210> 65
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Aptamer against chymase

<400> 65
 ggcagauaga guuaaagcc 19

<210> 66
 <211> 23
 <212> RNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Aptamer against chymase

<400> 66
 ggguuagauc gaguuaaaaa ccc 23

<210> 67
 <211> 23
 <212> RNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Aptamer against chymase

<400> 67
 ggguuagaua caguuaaaaa ccc 23

<210> 68
 <211> 23
 <212> RNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Aptamer against chymase

<400> 68
 ggguuagaua guguaaaaa ccc 23

<210> 69
 <211> 26
 <212> RNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Aptamer against chymase

<400> 69
 aaaggguuag auagaguuaa aaaccc 26

<210> 70
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Aptamer against chymase

<400> 70
gggtagaua gaguuaaaaa ccc 23

<210> 71
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Aptamer against chymase

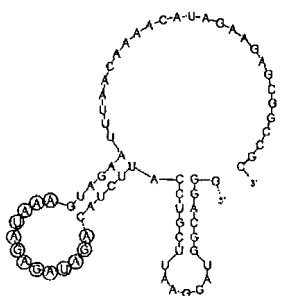
<400> 71
ggguuagaua gaktuaaaaa ccc 23

<210> 72
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial

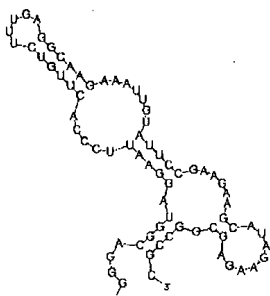
<220>
<223> Aptamer against chymase

<400> 72
gggtagaua gaktuaaaaa ccc 23

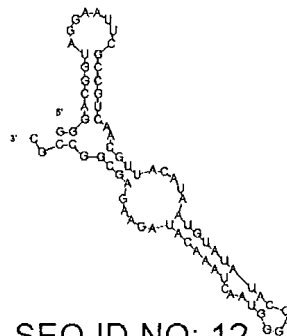
FIG. 1



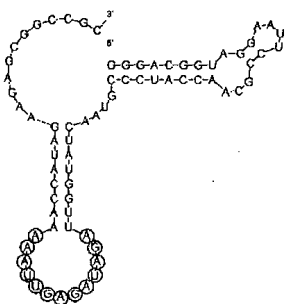
SEQ ID NO: 4



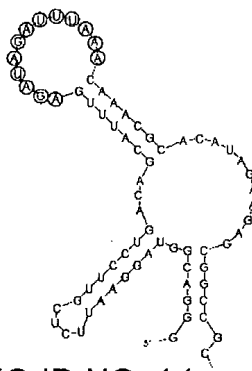
SEQ ID NO: 5



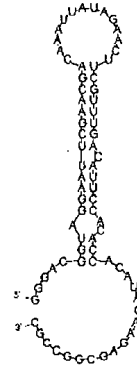
SEQ ID NO: 12



SEQ ID NO: 13



SEQ ID NO: 14



SEQ ID NO: 18

FIG. 2

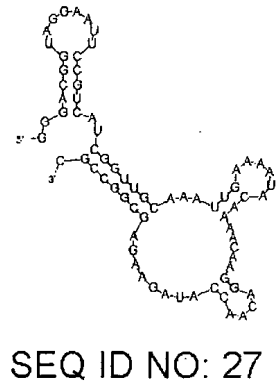
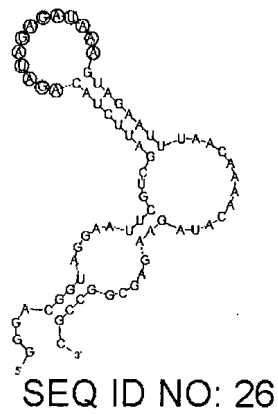
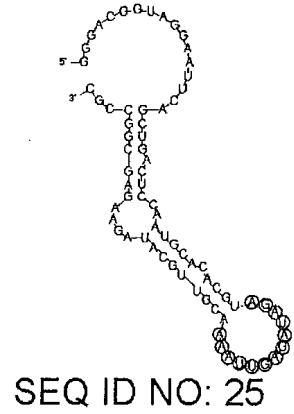
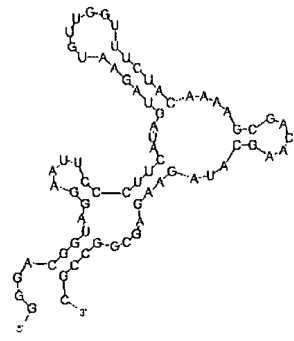
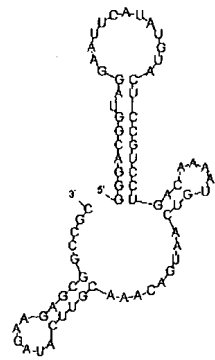
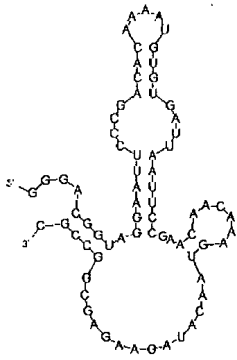


FIG. 3

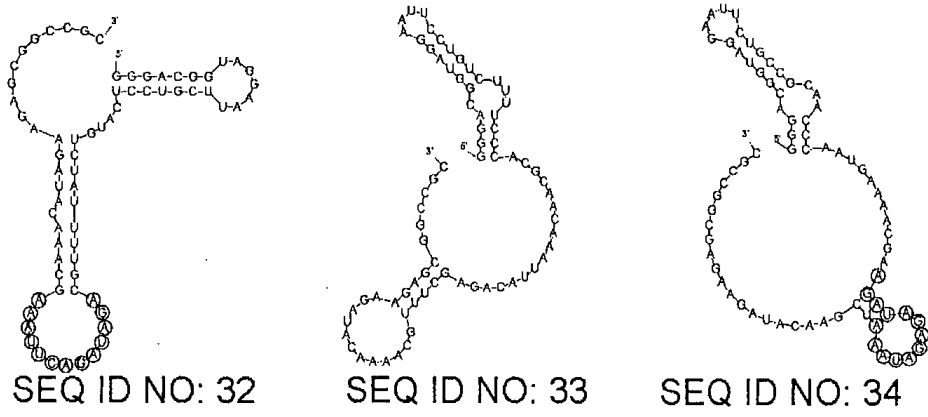
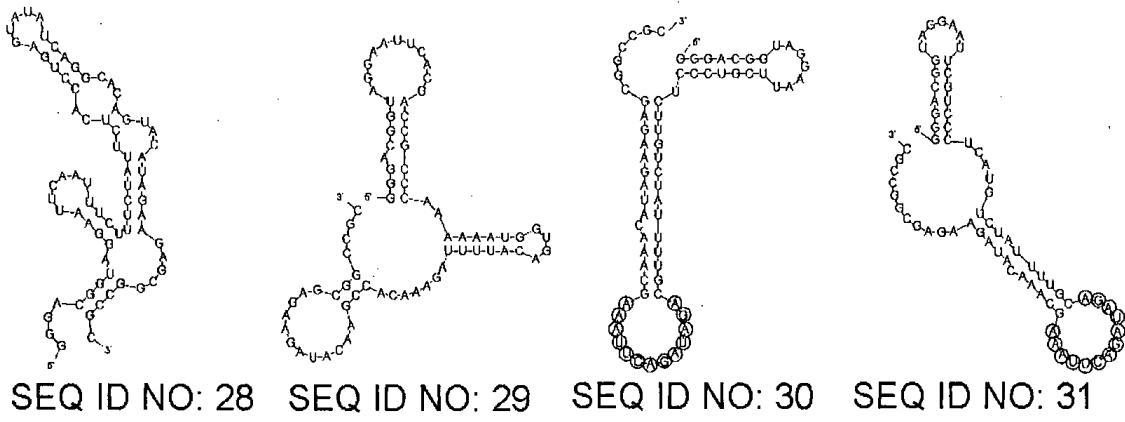


FIG. 4

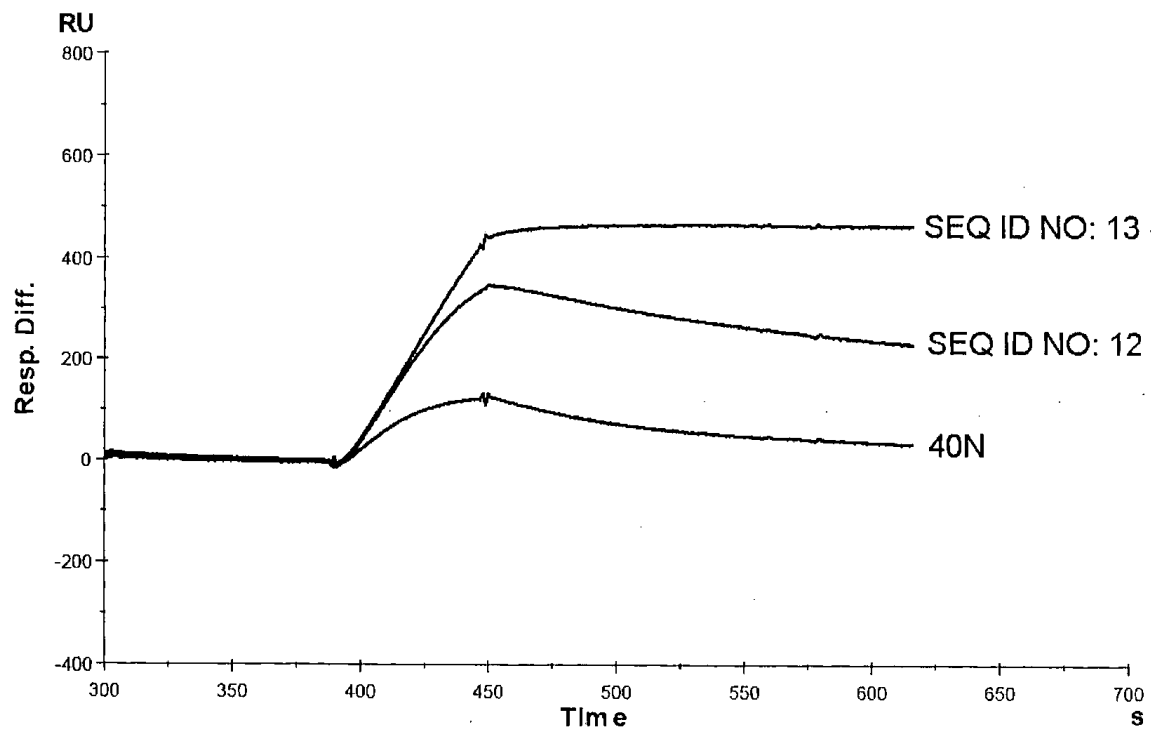
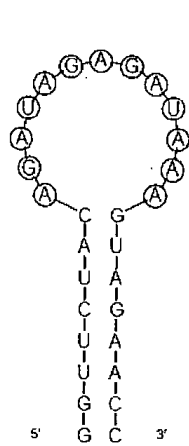
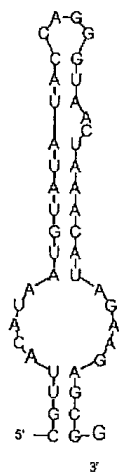


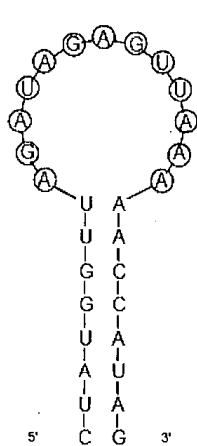
FIG. 6



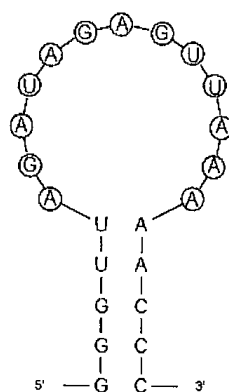
SEQ ID NO: 49



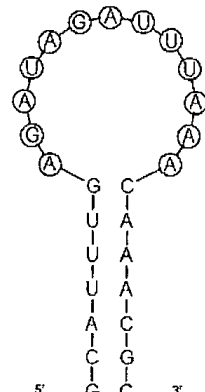
SEQ ID NO: 51



SEQ ID NO: 55



SEQ ID NO: 56



SEQ ID NO: 57

FIG. 7

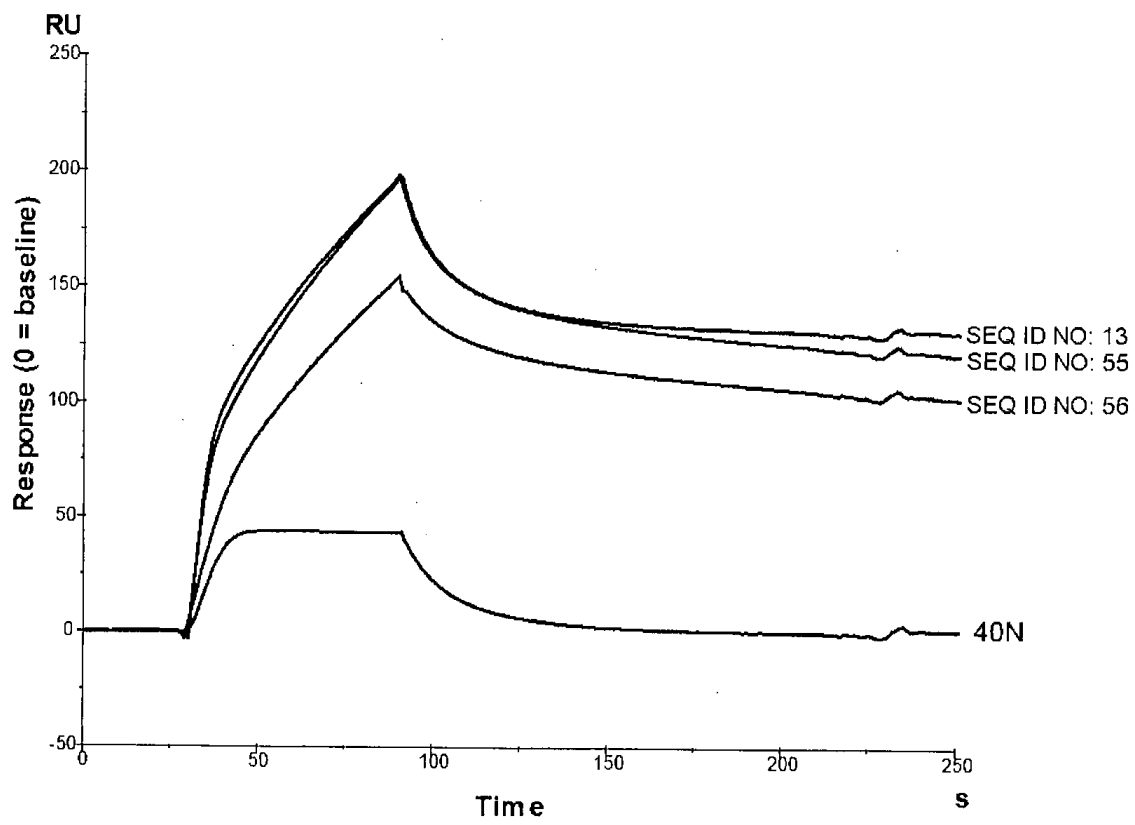
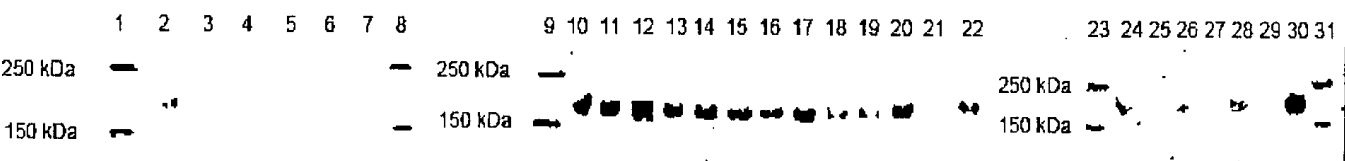


FIG. 8



APTÁMERO PARA QUIMASA Y SU USO

CAMPO TÉCNICO

5 La presente invención se refiere a un aptámero contra quimasa, un método de utilizarlos y similares.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 La quimasa humana (EC.3.4.21.39), una serina tipo quimotripsina se almacena en gránulos secretores de los mastocitos. Ante la estimulación externa, los mastocitos experimentan desgranulación, lo que genera la liberación de quimasa humana, junto con una amplia variedad de mediadores inflamatorios, fuera de las células. La quimasa humana liberada reconoce específicamente aminoácidos aromáticos contenidos
15 en sustratos proteicos y peptídicos, tales como fenilalanina y tirosina, y escinde los enlaces peptídicos contiguos a los aminoácidos. Un sustrato representativo para la quimasa humana es angiotensina I (AngI). La quimasa humana escinde AngI para producir angiotensina II (AngII), un factor vasoconstrictor.

Las quimasas de mamífero se clasifican filogenéticamente en dos
20 subfamilias: α y β . Los primates, que incluyen seres humanos, expresan solo una clase de quimasa, que pertenece a la familia α . Mientras tanto, los roedores expresan tanto las familias α y β de quimasa. En los ratones, existe una pluralidad de clases de quimasas, de las cuales la proteasa-4 de mastocitos de ratón (mMCP-4), que pertenece a la familia β , se considera la más estrechamente relacionada a la quimasa humana, evaluada a partir
25 de sus especificidad de sustrato y modo d de expresión en el tejido. En los hámster, la quimasa-1 de hámster, también un miembro de la familia β , corresponde a la quimasa humana. Mientras tanto, mMCP-5 y quimasa-2 de hámster, que pertenece a la familia α

como con quimasa humana, posee actividad tipo elastasa y difiere de la quimasa humana en términos de especificidad de sustrato.

La quimasa está profundamente asociada con la activación del factor crecimiento transformante β (TGF- β). TGF- β existe en una forma latente (TGF- β latente) en matrices extracelulares alrededor de las células epiteliales y células endoteliales y está retenido en las matrices extracelulares por medio de la proteína de unión a TGF- β latente grande (LTBP). TGF- β se libera de las matrices extracelulares según se requiera y se activa, y que el TGF- β activado es una citoquina de primordial importancia para los organismos vivos, según se ha informado, que está involucrada en la proliferación y diferenciación celular y la reparación y regeneración del tejido después de la lesión del tejido. El colapso de su señal lleva al inicio y progresión de una amplia variedad de enfermedades. Se considera que en este proceso, la quimasa está involucrada en la liberación de la TGF- β latente de las matrices extracelulares y la conversión de la TGF- β latente a TGF- β activa.

Se sabe que la quimasa se asocia con una amplia variedad de enfermedades, que incluye fibrosis, enfermedades cardiovasculares, inflamación, enfermedades alérgicas y adhesión a los órganos. La fibrosis es una enfermedad caracterizada por el metabolismo anormal de sustratos extracelulares en el pulmón, corazón, hígado, riñón, piel y similares, lo que produce un exceso de depósito de proteínas del tejido conectivo. En la fibrosis pulmonar, por ejemplo, las proteínas de tejido conectivo tales como el depósito de colágeno en exceso en el pulmón, lo que produce contracción intensa de los alvéolos pulmonares y conduce a enfermedades respiratorias. Se ha demostrado que la fibrosis pulmonar proviene de la pneumoconiosis, que es causada por la exposición a una gran cantidad de polvo, neumonía inducida por fármacos, que es causada por el uso de fármacos tales como agentes anticáncer, neumonía alérgica, tuberculosis pulmonar, enfermedades autoinmunes tales como enfermedad colágeno, y similares. Sin embargo, existen pocos casos en que la causa es desconocida.

El mecanismo de comienzo de la fibrosis a nivel molecular aún no se ha dilucidado bien. En general, en los estados normales, la proliferación y las funciones de los fibroblastos están bien controlados. En caso de inflamación o lesión seria o persistente, sin embargo, el mecanismo de reparación de tejidos trabaja en exceso, lo que origina la proliferación anormal de fibroblastos y la sobreproducción de las proteínas del tejido conectivo. El TGF- β es conocido como un factor que causa estos fenómenos. Como evidencia sugestiva de su compromiso, se ha informado que la administración de un anticuerpo neutralizante anti-TGF- β en un modelo de fibrosis animal causa disminución de la expresión de colágeno y suprime significativamente la fibrosis. En los pacientes con fibrosis pulmonar idiopática, el aumento de los niveles de TGF- β y se observan recuentos elevados de mastocitos positivos a quimasa.

Mientras tanto, se ha demostrado la asociación de quimasa en la fibrosis por experimentos usando modelos animales. En un modelo de hámster de fibrosis pulmonar inducida por bleomicina, actividad de quimasa facilitada, expresión aumentada de ARNm de colágeno III, fibrosis del tejido y otros fenómenos son reducidos significativamente por los inhibidores de quimasa. Los mismos efectos se han observado para un modelo de ratón de fibrosis pulmonar inducida por bleomicina; la administración de inhibidores de quimasa suprimió la actividad de quimasa y redujo el contenido de hidroxiprolina.

Con estos rasgos, se pueden usar inhibidores de quimasa como fármacos profilácticos o terapéuticos para enfermedades relacionadas con la quimasa, tales como fibrosis. Los inhibidores de quimasa que se han desarrollado incluyen compuestos de moléculas pequeñas tales como TPC-806, SUN-13834, SUN-C8257, SUN-C8077, y JNJ-10311795 (Documento de patente 1).

En años recientes, las aplicaciones de aptámeros de ARN para fármacos terapéuticos, reactivos de diagnóstico, y reactivos de ensayo han concitado la atención; algunos aptámeros de ARN ya están en etapa de estudio clínico o en uso práctico. En

diciembre de 2004, el primer fármaco e aptámero ARN del mundo, Macugen, fue aprobado como fármaco terapéutico para la degeneración macular relacionada con la edad en US. Un aptámero de ARN se refiere a un ARN que se une específicamente a una molécula blanco tal como una proteína, y se puede preparar usando el método SELEX

5 (Evolución sistemática de ligandos por enriquecimiento exponencial) (Documentos de patente 2-4). En el método SELEX, un ARN que se une específicamente a una molécula blanco se selecciona de la combinación de ARN con aproximadamente 10^{14} secuencias de nucleótidos diferentes. El ARN usado como una secuencia aleatoria de aproximadamente 40 nucleótidos, que está flanqueada por secuencias cebadoras. Esta

10 combinación de ARN se deja mezclar con una molécula blanco, y solo el ARN que se ha unido a la molécula blanco se separa usando un filtro y similares. El ARN separado se amplifica por RT-PCR, y se usa como un molde para la próxima ronda. Por la repetición de esta operación aproximadamente 10 veces, se puede obtener un aptámero de ARN que se une específicamente a la molécula blanco.

15 Los fármacos de aptámeros, como los fármacos de anticuerpos, pueden dirigirse a proteínas extracelulares. Con referencia a muchos documentos científicos y otros materiales de referencia de dominio público, se evalúan los fármacos de aptámeros para superar potencialmente a los fármacos de anticuerpos en algunos aspectos. Por ejemplo, los aptámeros con frecuencia exhiben mayor afinidad y especificidad para las

20 moléculas blanco que los anticuerpos. Los aptámeros poco probablemente experimenten eliminación inmune, y según se ha informado es poco probable que ocurran reacciones adversas características de los anticuerpos, tales como citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC) y citotoxicidad dependiente de complemento (CDC), con el uso de los aptámeros. Desde el punto de vista de la administración de fármacos, es

25 poco probable que los aptámeros migren a los tejidos debido a su tamaño molecular de aproximadamente un décimo de los anticuerpos, lo que permite una administración más sencilla a los sitios blanco. Debido a que los aptámeros se producen por síntesis química,

estos permiten modificaciones químicas selectiva del sitio y permiten la reducción de costos por la producción en masa. Otras ventajas de los aptámeros incluyen estabilidad de conservación a largo plazo, resistencia térmica y resistencia a solventes. Mientras tanto, la vida media sanguínea de los aptámeros es generalmente más corta que la de los anticuerpos; sin embargo, esta propiedad es algunas veces es ventajosa en vista de la toxicidad. Estos hechos llevan a la conclusión de que aun cuando se dirige a la misma molécula, los fármacos de aptámeros sobrepasan potencialmente fármacos de anticuerpo.

[Documento previo]

10 [Documento de patente]

[Documento de patente 1] USB6500835

[Documento de patente 2] WO91/19813

[Documento de patente 3] WO94/08050

[Documento de patente 4] WO95/07364

15

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Problemas resueltos por la invención

La presente invención se refiere a proporcionar un aptámero para quimasa
20 y un método para utilizarlos, y similares.

Medios para resolver problemas

Los presentes inventores investigaron con diligencia para resolver los problemas descritos anteriormente y tuvieron éxito en preparar un aptámero de buena
25 calidad para la quimasa, que dio como resultado la realización de la presente invención.

Por consiguiente, la presente invención proporciona las siguientes:

[1] Un aptámero que se une a quimasa para inhibir la actividad de quimasa.

[2] El aptámero de acuerdo con [1], que comprende una secuencia de nucleótidos representados por $X_1\text{GAUAGAN}_1\text{N}_2\text{UAAX}_2$ (SEQ ID NO: 21; cada uno de X_1 y X_2 , sea idéntico o no, es A o G, y cada uno de N_1 y N_2 , sea idéntico o no, es A, G, C, U o T).

5 [3] El aptámero de acuerdo con [2], en donde N_1N_2 es GA, GU, GC, UU, GT o CU.

[4] El aptámero de acuerdo con [2], en donde X_1 y X_2 are ambos A o ambos G.

10 [5] El aptámero de acuerdo con [3] o [4], en donde al menos uno de los nucleótidos pirimidínicos se ha modificado o alterado.

[6] El aptámero de acuerdo con [1], que comprende cualquiera de las secuencias de nucleótidos (a), (b) y (c) siguientes:

15 (a) un aptámero que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada entre SEQ ID NO: 4-34, 38-57, 59-65 y 69-72 (con la condición de que el uracilo puede ser timina);

(b) un aptámero que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada entre SEQ ID NO: 4-34, 38-57, 59-65 y 69-72 (con la condición de que el uracilo puede ser timina), en donde 1 a 5 nucleótidos están sustituidos, suprimidos, insertados o adicionados; y

20 (c) una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de 70% o más con una secuencia de nucleótidos seleccionada entre SEQ ID NO: 4-34, 38-57, 59-65 y 69-72 (con la condición de que el uracilo puede ser timina).

[7] El aptámero de acuerdo con [6], en donde al menos uno de los nucleótidos contenido en el aptámero se ha modificado o alterado.

25 [8] El aptámero de acuerdo con [1], cualquiera de las secuencias de nucleótidos (a'), (b') y (c') siguientes:

(a') una secuencia de nucleótidos seleccionada entre SEQ ID NO: 56(1)-

56(7), 56(9), 56(11), 56(12), 56(15)-56(52), 61(1), 69(1), 69(2), y 72(1)-72(8) (con la condición de que el uracilo puede ser timina);

(b') una secuencia de nucleótidos seleccionada entre SEQ ID NO: 56(1)-56(7), 56(9), 56(11), 56(12), 56(15)-56(52), 61(1), 69(1), 69(2), y 72(1)-72(8) (con la
5 condición de que el uracilo puede ser timina), en donde 1 a 5 nucleótidos están sustituidos, suprimidos, insertados o adicionados; y

(c') una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de 70% o más con una secuencia de nucleótidos seleccionada entre SEQ ID NO: 56(1)-56(7), 56(9), 56(11), 56(12), 56(15)-56(52), 61(1), 69(1), 69(2), y 72(1)-72(8) (con la condición de que
10 el uracilo puede ser timina).

[9] El aptámero de acuerdo con [1], en donde cada uno de los grupos hidroxilo de las posiciones 2' de los respectivos nucleótidos pirimidínicos contenidos en el aptámero, sea idéntico o no, puede estar sustituido con un átomo o un grupo
15 seleccionado del grupo que consiste en a átomo de hidrógeno, un átomo de flúor y un grupo metoxi.

[10] El aptámero de acuerdo con [1], en donde cada grupo hidroxilo de las posiciones 2' de los respectivos nucleótidos purínicos contenidos en el aptámero, sea idéntico o no, pueden estar sustituidos con un átomo o un grupo seleccionado del grupo
que consiste en a átomo de hidrógeno, un átomo de flúor y un grupo metoxi.

20 [11] A complejo que comprende cualquiera de los aptámeros [1] a [10] y a sustancia funcional.

[12] El complejo de acuerdo con [11], en donde la sustancia funcional es una sustancia de afinidad, una sustancia para marcación, una enzima, un vehículo de administración del fármaco o un fármaco.

25 [13] Un agente farmacéutico que comprende cualquiera de los aptámeros [1] a [10] o el complejo [11] o [12].

[14] El agente farmacéutico de acuerdo con [13], que se usa para prevenir

o tratar una enfermedad cardiovascular o fibrosis.

[15] A reactivo de diagnóstico que comprende cualquiera de los aptámeros [1] a [10] o el complejo [11] o [12].

5 [16] A sonda de detección de quimasa que comprende cualquiera de los aptámeros [1] a [10] o el complejo [11] o [12].

[17] Un portador de fase sólida para la purificación de quimasa que comprende cualquiera de los aptámeros [1] a [10] o el complejo [11] o [12].

[18] Un método de detectar quimasa, que comprende usar cualquiera de los aptámeros [1] a [10] o el complejo [11] o [12].

10 [19] Un método de purificar quimasa, que comprende usar cualquiera de los aptámeros [1] a [10] o el complejo [11] o [12].

Efecto de la invención

15 El aptámero o el complejo de la presente invención pueden ser útiles como un agente farmacéutico o reactivo tal como un reactivo de diagnóstico para varias enfermedades causadas por la quimasa, tales como fibrosis y enfermedades cardiovasculares. El aptámero o el complejo de la presente invención también puede ser útil para purificar y concentrar quimasa, y detectar y cuantificar quimasa.

20 La Fig. 1 muestra la estructura secundaria del aptámero mostrado por la SEQ ID NO: 4, 5, 12-14, 18 predicha por el programa MFOLD, en donde la parte encerrada en un círculo muestra una secuencia común mostrada por la SEQ ID NO: 21.

La Fig. 2 muestra la estructura secundaria del aptámero mostrado por la SEQ ID NO: 22-27 predicha por el programa MFOLD, en donde la parte encerrada en un círculo muestra una secuencia común mostrada por la SEQ ID NO: 21.

25 La Fig. 3 muestra la estructura secundaria del aptámero mostrado por la SEQ ID NO: 28-34 predicha por el programa MFOLD, en donde la parte encerrada en un círculo muestra una secuencia común mostrada por la SEQ ID NO: 21.

La Fig. 4 muestra cómo el aptámero mostrado por la SEQ ID NO: 12 y 13 se une a quimasa, en donde 40N indica una mezcla de ARN que contiene una secuencia aleatoria de 40 nucleótidos. Como molécula de captura, cada aptámero o el control negativo 40N se inmovilizó; como analito se inyectó quimasa humana. Las mediciones se tomaron usando Biacore T100 (fabricado por GE Healthcare).

La Fig. 5 muestra la estructura secundaria del aptámero mostrado por la SEQ ID NO: 38-40, 43, 48 predicha por el programa MFOLD, en donde la parte encerrada en un círculo muestra una secuencia común mostrada por la SEQ ID NO: 21.

La Fig. 6 muestra la estructura secundaria del aptámero mostrado por la SEQ ID NO: 49, 51, 55-57 predicha por el programa MFOLD, en donde la parte encerrada en un círculo muestra una secuencia común mostrada por la SEQ ID NO: 21.

La Fig. 7 muestra cómo los aptámeros mostrados por la SEQ ID NO: 13, 55, y 56 se unen a la quimasa, en donde 40N indica una mezcla de ARN que contiene una secuencia aleatoria de 40 nucleótidos. La quimasa se inmovilizó en una superficie del chip; como analito, se inyectó cada aptámero o el control negativo 40N. Las mediciones se tomaron usando Biacore T100 (fabricado por Healthcare).

La Fig. 8 muestra los resultados de la detección por transferencia Western de cómo se degradó LTBP-1 por la quimasa y cómo la degradación de LTBP-1 fue inhibida por los aptámeros listados en el Cuadro 9. Los números de calle 1, 8, 9, 23, y 31 muestran los marcadores; los números de calle 6, 21, y 29 muestran los resultados de los controles negativos (sin inhibidor); los números de calle 7, 22, y 30 muestran los resultados para los controles libres de quimasa.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención proporciona un aptámero que posee una actividad de unión para la quimasa. Los aptámeros de la presente invención son capaces de inhibir

actividades de la quimasa.

Un aptámero se refiere a una molécula de ácido nucleico que tiene una afinidad de unión para una molécula blanco particular. El aptámero también puede inhibir la actividad de una molécula blanco particular por la unión a la molécula blanco particular.

- 5 El aptámero de la presente invención posee la actividad de unión para la quimasa, y es capaz de inhibir una actividad de quimasa. El aptámero de la presente invención puede ser un ARN, un ADN, un ácido nucleico modificado o una mezcla de ellos. El aptámero de la presente invención también puede estar en forma lineal o circular.

- 10 La quimasa, una serina proteasa conocida públicamente, se almacena en los gránulos secretores de los mastocitos. La quimasa está profundamente involucrada en una amplia variedad de reacciones biológicas mediadas por los mastocitos, que incluyen, por ejemplo, la producción y degradación de péptidos bioactivos, remodelación de la matriz extracelular, redes con citoquinas, e inmunidad. El aptámero de la presente invención puede exhibir actividad inhibidora contra la quimasa derivada de cualquier
- 15 mamífero. Dichos mamíferos incluyen primates (por ejemplo, seres humanos, monos), roedores (por ejemplo, ratones, ratas, cobayos, hámster), y animales de compañías, animales domesticados y animales de trabajo (por ejemplo, perros, gatos, caballos, vacas, cabras, ovejas, cerdos), con preferencia para los seres humanos. La secuencia de aminoácidos de la quimasa humana se muestra con el Número de acceso AAB26828, y
- 20 puede ser una secuencia que tiene uno a varios residuos mutados, un residuo del dominio de este o un residuo del péptido de este. La estructura de la quimasa humana puede ser no sólo un monómero, sino también un dímero o polímero.

- El aptámero de la presente invención se une a la quimasa en soluciones de buffer fisiológico. Si bien no existe limitación en cuanto a la elección de la solución buffer,
- 25 se da preferencia a las soluciones de buffer que tienen un pH de aproximadamente 5.0-10.0. Dichas soluciones de buffer incluyen, por ejemplo, la solución A y solución C que se describen más adelante (ver Ejemplos 1 y 2). El aptámero de la presente invención se une

a la quimasa a una concentración detectable por cualquiera de las pruebas que se describen a continuación.

La fuerza de unión se mide usando Biacore T100 (fabricado por GE Healthcare). En un método de medición, el aptámero se inmoviliza primero en un chip sensor, la cantidad inmovilizada es de aproximadamente 1000 RU. Se inyectan 20 μ L de una solución de quimasa para analito, preparada a 0.2 μ M, y se detecta la unión de la quimasa al aptámero. Un ARN que comprende una secuencia de nucleótidos aleatoria de 30 o 40 nucleótidos se usa como un control negativo. Si la quimasa se une al aptámero en forma equivalente o significativamente más potente en comparación con el ARN control, se considera que el aptámero tiene la capacidad de unirse a la quimasa.

En otro método, la quimasa se inmoviliza primero sobre un chip sensor, la cantidad inmovilizada es de aproximadamente 4000 RU. Se inyectan 20 μ L de una solución de aptámero para analito, preparada a 0.01 μ g/ μ L, y se detecta la unión de la quimasa al aptámero. Un ARN que contiene una secuencia de nucleótidos aleatoria de 30 o 40 nucleótidos se usa como control negativo. Si la quimasa se une al aptámero en forma equivalente o significativamente más potente en comparación con el ARN control, se considera que el aptámero tiene la capacidad de unirse a la quimasa.

Una actividad inhibidora contra la quimasa significa un potencial inhibidor contra cualquiera de las actividades poseída por la quimasa. Por ejemplo, se inhibe la actividad enzimática para hidrolizar y escindir cadenas peptídicas, que es una de las funciones de la quimasa. Los sustratos aceptables para la actividad enzimática no se limitan a proteínas y péptidos bioactivos presentes en los organismos vivos (por ejemplo, AngI, TGF- β latente y similares), sino que incluye los péptidos, que contienen secuencias de aminoácidos parciales de los péptidos anteriores, conjugados con una sustancia cromogénica o sustancia fluorescente. Las sustancias cromogénicas y las sustancias fluorescentes son conocidas por los expertos en la técnica. Los fenómenos que se producen por medio de las reacciones de degradación de proteínas o péptidos bioactivos

incluyen aumento de expresión de colágeno I/III, aumento del contenido de hidroxiprolina, aumento de expresión de IgE y similares; los efectos supresores sobre estos también se incluyen en las actividades inhibitoras contra quimasa. Además, las actividades inhibitoras contra la migración de neutrófilos, monocitos y eosinófilos a quimasa también se incluyen en la actividad inhibitora contra quimasa. Por otra parte, también se incluyen los efectos supresores contra la promoción de la liberación de histamina inducida por quimasa, elevación del recuento de mastocitos, aumento de la permeabilidad vascular, fibrosis tisular, inflamación, angiogénesis, engrosamiento de la íntima vascular y similares en las actividades inhibitoras contra quimasa.

10 Un sustrato para quimasa significa un péptido, proteína o similares que experimenta la escisión hidrolítica por la quimasa. Se sabe que los sustratos para quimasa que existen en los organismos vivos incluyen péptidos y proteínas tales como AngI, TGF- β latente, factor de mastocitos (SCF), procolágeno, procolagenasa, fibronectina, metaloproteasa 1 de promatriz (pro-MMP-1), pro-MMP-9, inhibidor tisular de la metaloproteinasa-1 de matriz (TIMP-1), apolipoproteína A-I (apoA-I), apoE, proteína de transferencia de fosfolípidos, precursor de IL-1 β , big-endotelina 1 (big-ET-1), big-ET-2, péptidos activador del tejido conectivo III, precursor de IL-18, sustancia P, péptido intestinal vasoactivo (VIP), kalidina, bradiquinina, y C3a. En la presente, los sustratos de quimasa no se limitan a estos, sino que incluyen los péptidos del modelo diseñado artificialmente que comprenden residuos de aminoácidos reconocidos específicamente por la quimasa, tales como Phe y Tyr, así como estos péptidos conjugados con sustancia cromogénica o sustancia fluorescente.

Si un aptámero inhibe la actividad enzimática de la quimasa se puede determinar, por ejemplo, los tres métodos de análisis que se describen a continuación.

25 Un primer método emplea un sustrato sintético. Un sustrato de quimasa útil es Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-MCA (grupo 4-metilcumaril-7-amida) (fabricado por Peptide Institute, Inc.), que contiene el péptido de 4 aminoácidos "Ala-Ala-Pro-Phe", un sustrato

estándar para las proteasas tipo quimotripsina.

El ensayo se realiza usando una placa de 96 pocillos (F16 Black Maxisorp Fluoronunc, fabricado por Nunc), con un volumen de la mezcla de reacción de 100 μ L, en una solución buffer (solución C; ver Ejemplo 2 siguiente). Primero, cada ácido nucleico se
5 prepara en solución C para obtener soluciones de 50 μ L. Después de añadir 10 μ L del sustrato 1 mM preparado en la solución C, la placa se ajusta al lector de microplaca SpectraMax190 (fabricado por Molecular Devices Corporation), y se incuba a 37°C durante 5 minutos. En forma separada, 0.05 μ g de quimasa (recombinante, fabricado por SIGMA) se diluye en la solución C, y 40 μ L de esta dilución se incuba a 37°C durante 5
10 minutos. La solución de quimasa se añade a la mezcla del ácido nucleico y sustrato para iniciar una reacción enzimática. La placa que contiene la reacción mixture se ajusta al lector de microplaca SpectraMax190 (fabricado por Molecular Devices Corporation), y se examina para determinar los cambios dependientes del tiempo de la intensidad de fluorescencia a 37°C durante 5 minutos (longitud de excitación 380 nm, longitud de
15 detección 460 nm). Se genera una aproximación lineal del aumento de la fluorescencia del AMC (7-amino-4-metilcumarina) liberada del sustrato por la actividad de quimasa, y se toma su pendiente como la velocidad de reacción inicial. Para control, las muestras se tratan y analizan de la misma manera en dos casos: uso de una combinación de ácidos nucleicos que contiene una secuencia aleatoria de 30 o 40 nucleótidos (control negativo),
20 y uso de quimostatina, un inhibidor de serina proteasa tipo quimotripsina conocido (control positivo). Tomando la velocidad de reacción inicial sin el ácido nucleico e inhibidor como 100% de actividad enzimática, se calcula la tasa inhibitoria para cada sustancia de ensayo y se determina la concentración inhibidora necesaria para producir un 50% de inhibición de la actividad enzimática (IC_{50}). Un aptámero que exhibe un valor de IC_{50} menor que el
25 de la quimostatina, un inhibidor conocido, se considera que posee una excelente actividad inhibidora.

Un segundo método de evaluación emplea un sustrato nativo. Un sustrato

nativo para quimasa útil es angiotensina I. En la presente, His-Leu, un fragmento peptídico liberado después de la degradación de angiotensina I, se derivativa en forma fluorescente y se cuantifica la intensidad de fluorescencia a partir de este.

En el ensayo, se lleva acabo una reacción enzimática en 50 μ L de solución

5 C. Primero, 0.3-0.75 ng de quimasa (recombinante, fabricada por SIGMA; o nativa, fabricada por Calbiochem) se diluye en la solución C para obtener 5 μ L de solución de quimasa. Cada ácido nucleico se prepara en solución C para obtener soluciones de 25 μ L. 5 μ L de cada dilución de quimasa y se mezclan 25 μ L de cada ácido nucleico solución, y luego la mezcla se incuba a 37°C durante 5 minutos. De forma separada, se preparan 20

10 μ L de angiotensina I 125 μ M (fabricada por Peptide Institute, Inc.) en la solución C y se incuba a 37°C durante 5 minutos. La solución de angiotensina I se añade a la mezcla de quimasa y ácido nucleico, y se inicia la reacción enzimática. Después de dejar proceder la reacción a 37°C durante 90 minutos, se añaden 25 μ L de solución de 30% de ácido tricloroacético enfriado en hielo para terminar la reacción. La mezcla completa se

15 centrifuga a 4°C, 14000 rpm durante 10 minutos, y se usan 30 μ L del sobrenadante resultante para la posterior reacción para la derivatización fluorescente.

Después de añadir 30 μ L del sobrenadante a una placa de 96 pocillos (Black, fabricada por Costar), se mezclan 15 μ L de solución de 2% o-ftalaldehído (fabricado por SIGMA) en metanol y 170 μ L de solución de NaOH 0.3 M en cada pocillo, y

20 la placa se deja decantar a temperatura ambiente durante 10 minutos. Posteriormente, se añaden 25 μ L de solución de HCl 3 M para terminar la reacción. La placa se ajusta al lector de microplaca SpectraMax190 (fabricado por Molecular Devices Corporation), y se determina la intensidad de fluorescencia a una longitud de excitación de 355 nm y una longitud de fluorescencia de 460 nm.

25 Para el control, las muestras se tratan y analizan de la misma manera en dos casos: uso de la SEQ ID NO: 58 (control negativo) y uso de la quimostatina, un

inhibidor de serina proteasa tipo quimotripsina conocido (control positivo). En ambos casos, la intensidad de fluorescencia obtenida en el tiempo de reacción de 0 minuto sirve como una determinación del blanco. La intensidad de fluorescencia detectada con la adición de un volumen igual de la solución C, en lugar de cada ácido nucleico, en la
5 reacción enzimática de quimasa como 100%, se calcula la tasa inhibitoria para cada sustancia de ensayo, y se determina la concentración inhibitoria necesaria para causar un 50% de inhibición de la actividad enzimática (IC_{50}). Un aptámero que exhibe un valor de IC_{50} menor que el de la quimostatina, un inhibidor conocido, se considera que posee una excelente actividad inhibitoria.

10 Un tercer método de evaluación emplea una sustancia nativa contenida en un sobrenadante del cultivo celular. En la presente, la degradación del sustrato de quimasa LTBP-1 se detecta por transferencia Western. Las células NHLF (fabricado por Cambrex Bio Science) bajo congelamiento se descongelaron rápidamente en un baño de agua 37°C y luego se suspendieron en un medio (10% de FBS/F-12). Después de la
15 centrifugación a 1200 rpm durante 5 minutos, se extrae el sobrenadante resultante, y las células se resuspenden en el medio. El volumen total de 10 mL de medio se añade a las células centrifugadas, y la suspensión celular se transfiere a una placa de cultivo celular y se cultiva a 37°C en presencia de 5% de CO_2 . Las células se observan en cuanto a estado de morfología y proliferación bajo un microscopio. Cuando las células son
20 confluentes, el medio se reemplaza con un medio libre de suero (0.2% de BSA/F-12). Dos días después del reemplazo del medio, el sobrenadante del cultivo se recolecta, dispensa y almacena bajo congelamiento a -30°C.

Posteriormente 40 μ L del sobrenadante del cultivo NHLF, recién descongelado antes de usar, se dispensan en un tubo, 5 μ L de la solución de ácido
25 nucleico diluida con la solución C se añaden al tubo. Para el control positivo, la quimostatina se diluye con la solución C, y esta dilución se añade de la misma manera. Para el control negativo, se añade solución C sola. Después, se añaden 5 μ L de una

dilución de 100 ng/mL de quimasa en la solución E (solución C+0.1% de BSA, 0.05% de azida sódica). Para control, se prepara un tubo libre de quimasa. Después de agitar, la muestra se incuba a 37°C durante 1 hora, y se mezcla con un volumen igual de buffer de lisis para electroforesis para terminar la reacción. LTBP-1 de la muestra se detecta por el
5 procedimiento de transferencia Western que se describe más adelante.

La muestra mezclada en el buffer de lisis se hierve durante 3 minutos, y 10 µL de la muestra se someten a electroforesis en gel de acrilamida 5-20%. Después de finalizar la electroforesis, la muestra se transfiere a un filtro nitrocelulosa, después de lo cual el filtro se bloquea con 5% de leche descremada, 50 mM de Tris-HCl (pH 8.0), y
10 0.05% de azida sódica. El filtro se hace reaccionar con 2 µg/mL de dilución de anticuerpo anti-LTBP-1 monoclonal en 2% de BSA, PBS, y 0.05% de azida sódica a temperatura ambiente durante la noche. El filtro se lava 3 veces y se incuba con solución de anticuerpo secundario (anticuerpo IgG anti-ratón marcado con HRP diluido 10000 veces con 0.1% de BSA/PBS) a temperatura ambiente durante 2 horas. El filtro se lava 5 veces, y la
15 detección se realiza usando un sustrato quimioluminiscente.

Como se determinó de acuerdo con la densidad y posición de la banda de LTBP-1 (peso molecular), la banda del pocillo libre de quimasa sirve para control positivo (+), y la banda del pocillo de control negativo sirve para el control negativo (-). Cada sustancia de ensayo se examina para determinar la actividad inhibidora por inspección
20 visual.

No hay limitación respecto del aptámero de la presente invención, siempre que sea capaz de unirse a cualquiera de las porciones de quimasa para inhibir la actividad de este.

La longitud del aptámero de la presente invención no está limitada y
25 usualmente pueden ser aproximadamente 10 a aproximadamente 200 nucleótidos, y puede ser, por ejemplo, no más de aproximadamente 100 nucleótidos, con preferencia no más de aproximadamente 50 nucleótidos, con más preferencia no más de

aproximadamente 40 nucleótidos, con máxima preferencia no más de aproximadamente 30 nucleótidos. Cuando la cantidad total de nucleótidos es más pequeña, la síntesis química y la producción en masa será más sencilla, y hay una ventaja principal en términos de costo. También se considera que la modificación química es sencilla, la

5 estabilidad en el cuerpo es alta, y la toxicidad es baja.

Cada uno de los nucleótidos contenidos en el aptámero de la presente invención, sea idéntico o diferente, puede ser un nucleótido que comprende un grupo hidroxilo en la posición 2' de la ribosa (por ejemplo, ribosa de nucleótido pirimidínico, ribosa de nucleótido purínico) (es decir, un nucleótido no sustituido) o un nucleótido

10 sustituido con cualquier átomo o grupo en la posición 2' de la ribosa. Como ejemplos de cualquier átomo o grupo, se pueden mencionar un nucleótido sustituido con 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-COMe), o un grupo amino (por ejemplo, grupo -NH₂).

El aptámero de la presente invención tiene una secuencia representada por

15 $X_1GAUAGAN_1N_2UAAX_2$ (SEQ ID NO: 21; en donde cada uno de X_1 y X_2 , sea idéntico o no, es A o G, y cada uno de N_1 y N_2 , sea idéntico o no, es A, G, C, U o T; con la condición de que el uracilo puede ser timina). Un aptámero que tiene esta secuencia se une fuertemente a la quimasa para inhibir la actividad de quimasa.

En la fórmula anterior, X_1 y X_2 con preferencia son ambos A o ambos G;

20 N_1N_2 con preferencia es GA, GU, GC, UU, GT o CU (con la condición de que el uracilo puede ser timina).

El aptámero de la presente invención también puede ser el nucleótido en donde al menos una clase (por ejemplo, 1, 2, 3 o 4 clases) de nucleótidos comprende un grupo hidroxilo, o el anteriormente descrito cualquier átomo o grupo, por ejemplo, al

25 menos dos clases (por ejemplo, 2, 3 o 4 clases) de grupo seleccionados del grupo que consiste en un átomo de hidrógeno, un átomo de flúor, un grupo hidroxilo y un grupo metoxi, en la posición 2' de ribosa.

En el aptámero de la presente invención, todos los nucleótidos pirimidínicos pueden ser nucleótidos sustituidos con un átomo de flúor, o nucleótidos sustituidos con cualquier átomo o grupo mencionado antes, con preferencia un átomo o grupo seleccionado del átomo o grupo que consiste en un átomo de hidrógeno, un grupo hidroxilo y un grupo metoxi sea idéntico o no, en la posición 2' de la ribosa.

En los aptámeros de la presente invención, todos los nucleótidos purínicos pueden ser nucleótidos que comprende un grupo hidroxilo, o nucleótido sustituido con cualquier átomo o grupo mencionado antes, con preferencia un átomo o un grupo seleccionado del grupo que consiste en a átomo de hidrógeno, un grupo metoxi, y un átomo de flúor, sea idéntico o no, en la posición 2' de ribosa.

El aptámero de la presente invención también puede ser uno en donde todos los nucleótidos comprenden idénticamente comprenden un grupo hidroxilo, o cualquier átomo o grupo mencionado antes, por ejemplo, el grupo idéntico seleccionado por el grupo que consiste en un átomo de hidrógeno, un átomo de flúor, a grupo hidroxilo y un grupo metoxi, en la posición 2' de ribosa.

En la presente, en esta memoria descriptiva, se asume que los nucleótidos que constituyen el aptámero son ARN (es decir, se asume que los grupos azúcar son ribosa) para describir cómo están modificados los grupos azúcar de los nucleótidos. Sin embargo, esto no significa que el ADN esté exento de nucleótidos que constituyen el aptámero, y una modificación de ARN se debe leer como una modificación de ADN según corresponda. Cuando el nucleótido que constituye el aptámero es ADN, por ejemplo, la sustitución del grupo hidroxilo en la posición 2' de la ribosa por X se debe leer como una sustitución de un átomo de hidrógeno en la posición 2' de desoxirribosa por X.

El aptámero de la presente invención también puede ser:

(a) un aptámero que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada entre SEQ ID NO:4-34, 38-57, 59-65 y 69-72 (con la condición de que el uracilo puede ser timina);

(b) un aptámero que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada entre SEQ ID NO:4-34, 38-57, 59-65 y 69-72 (con la condición de que el uracilo puede ser timina), en donde 1 a 5 nucleótidos están sustituidos, suprimidos, insertados o adicionados; o

5 (c) un aptámero que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de 70% o más (con preferencia 80% o más, con más preferencia 90% o más, con máxima preferencia 95% o más) a una secuencia de nucleótidos seleccionada entre SEQ ID NO: 4-34, 38-57, 59-65 y 69-72 (con la condición de que el uracilo puede ser timina). El aptámero de la presente invención también incluye:

10 (d) un conjugado seleccionado del grupo que consiste en un conjugado de una pluralidad de aptámeros (a) anterior, un conjugado de una pluralidad de aptámeros (b) anterior, un conjugado de una pluralidad de aptámeros (c) anterior, y un conjugado de una pluralidad de aptámeros (a), (b) y (c) anterior.

No sólo el aptámero (a) anterior, pero también los aptámeros (b) a (d) son
15 capaces de unirse a quimasa y/o inhibir una actividad de quimasa (actividad enzimática de quimasa y similares).

El aptámero de la presente invención también puede ser:

(a') un aptámero que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada entre las SEQ ID NO: 56(1)-56(7), 56(9), 56(11), 56(12), 56(15)-56(52),
20 61(1), 69(1), 69(2) y 72(1)-72(8) (con la condición de que el uracilo puede ser timina);

(b') un aptámero que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada entre las SEQ ID NO: 56(1)-56(7), 56(9), 56(11), 56(12), 56(15)-56(52), 61(1), 69(1), 69(2) y 72(1)-72(8) (con la condición de que el uracilo puede ser timina), en donde 1 a 5 nucleótidos están sustituidos, suprimidos, insertados o adicionados; o

25 (c') un aptámero que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de 70% o más con una secuencia de nucleótidos seleccionada entre SEQ ID NO: 56(1)-56(7), 56(9), 56(11), 56(12), 56(15)-56(52), 61(1), 69(1), 69(2) y 72(1)-72(8)

(con la condición de que el uracilo puede ser timina). El aptámero de la presente invención también incluye:

(d') un conjugado seleccionado del grupo que consiste en un conjugado de una pluralidad de aptámeros (a') anterior, un conjugado de una pluralidad de aptámeros (b') anterior, un conjugado de una pluralidad de aptámeros (c') anterior, y un conjugado de una pluralidad de aptámeros (a'), (b') y (c') anterior. Por otra parte, el aptámero de la presente invención también incluye:

(e) un conjugado que consiste en uno o más aptámeros seleccionados del grupo que consiste en (a), (b) y (c) anterior, y uno o más aptámeros seleccionados del grupo que consiste en (a'), (b') y (c').

Los aptámeros (a')-(d') y (e) anteriores también son capaces de unir a quimasa y/o inhibir una actividad de quimasa (actividad enzimática de quimasa y similares).

En (b) y (b') anteriores, no existe limitación sobre la cantidad de nucleótidos sustituidos, suprimidos, insertados o adicionados, siempre que el aptámero sea capaz de unirse a quimasa y/o inhibir una actividad de quimasa (actividad enzimática de quimasa y similares). La cantidad de nucleótidos puede ser, por ejemplo, no más de aproximadamente 30, con preferencia no más de aproximadamente 20, con más preferencia no más de aproximadamente 10, aún con más preferencia no más de 5, con máxima preferencia 4, 3, 2 ó 1.

Con respecto a (c) y (c') anteriores, "una identidad" significa una relación (%) de residuos de nucleótidos idénticos con los residuos de nucleótidos superpuestos en el alineamiento óptimo donde dos secuencias de nucleótidos se alinean usando un algoritmo matemático conocido en el campo técnico (con preferencia, el algoritmo considera la introducción de brechas en una o ambas de las secuencias para el mejor alineamiento).

La identidad de la secuencia de nucleótidos en la presente descripción se

puede calcular, por ejemplo, por el alineamiento de las dos secuencias de nucleótidos usando el algoritmo de cálculo de homología NCBI BLAST-2 (National Center for Biotechnology Information Basic Local Alignment Search Tool) en las siguientes condiciones (abertura de brecha=5 penalizaciones; extensión de brecha=2
5 penalizaciones; x_descenso=50; expectativa=10; filtración=ON).

En (d), (d') y (e) anteriores, la conjugación se puede lograr por la unión en tándem. En la conjugación, se puede utilizar un ligador. Como ligador, se pueden mencionar las cadenas de nucleótidos (por ejemplo, 1 a aproximadamente 20 nucleótidos) y las cadenas no nucleotídicas (por ejemplo, ligador $-(CH_2)_n$ -, ligador $-(CH_2CH_2O)_n$ -,
10 ligador de hexaetilen glicol, ligador de TEG, ligador que contiene péptido, ligador que contiene el enlace -S-S-, ligador que contiene el enlace -CONH-, ligador que contiene el enlace -OPO₃-). La pluralidad mencionada en la pluralidad de conjugados descripta anteriormente no está particularmente limitada, siempre que sea de dos o más, y la pluralidad puede ser, por ejemplo, 2, 3 o 4. Cada uno de los nucleótidos en (a) a (d), (a') a
15 (d') y (e) anteriores, sean idéntico o diferente, puede ser un nucleótido que comprende un grupo hidroxilo en la posición 2' de ribosa o un nucleótido sustituido con cualquier grupo (por ejemplo, átomo de hidrógeno, átomo de flúor o grupo -O-Me) en la posición 2' de ribosa (por ejemplo, ribosa del nucleótido pirimidínico).

El aptámero de la presente invención puede ser un residuo de azúcar (por
20 ejemplo, ribosa) de cada nucleótido ha sido modificado para aumentar la actividad de unión a quimasa, estabilidad, capacidad de aplicación del fármaco y similares. Como ejemplos del sitio modificado en un residuo de azúcar, se puede mencionar uno que tiene el átomo de oxígeno en la posición 2', posición 3' y/o posición 4' del residuo de azúcar reemplazado con otro átomo, y similares. Como ejemplos de la modificación, se puede
25 mencionar fluoración, O-alquilación (por ejemplo, O-metilación, O-etilación), O-arilación, S-alquilación (por ejemplo, S-metilación, S-etilación), S-arilación, y aminación (por ejemplo, -NH₂). Dichas alteraciones en el residuo de azúcar se puede realizar por un

método conocido per se (ver, por ejemplo, Sproat et al., (1991) Nucle. Acid. Res. 19, 733-738; Cotton et al., (1991) Nucl. Acid. Res. 19, 2629-2635; Hobbs et al., (1973) Biochemistry 12, 5138-5145).

El aptámero de la presente invención también puede tener una base de
5 ácido nucleico (por ejemplo, purina o pirimidina) alterado (por ejemplo, sustitución química) para incrementar la actividad de unión a quimasa y similares. Como ejemplos de dichas alteraciones, se pueden mencionar alteración de posición 5 de pirimidina, alteración de la posición 6 y/o 8 de la purina, alteración con una amina extracíclica, sustitución con 4-tiouridina, y sustitución con 5-bromo o 5-yodo uracilo.

10 El grupo fosfato contenido en el aptámero de la presente invención se puede alterar para conferir resistencia a la nucleasa e hidrólisis. Por ejemplo, el grupo $P(O)O$ se puede sustituir con $P(O)S$ (tioato), $P(S)S$ (ditioato), $P(O)NR_2$ (amidato), $P(O)CH_3$, $P(O)BH_3$, $P(O)R$, $R(O)OR'$, CO o CH_2 (formacetal) o 3'-amina ($-NH-CH_2-CH_2-$) [en donde cada unidad de R o R' es de modo independiente H o un alquilo sustituido o no
15 sustituido (por ejemplo, metilo, etilo)].

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

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

20 También se puede realizar una alteración por el añadido de un extremo, un polietilenglicol, aminoácido, péptido, dT invertido, ácido nucleico, nucleósidos, miristoílo, litocólico-oleílo, docosanilo, lauroílo, estearoílo, palmitoílo, oleoílo, linoleílo, otros lípidos, esteroides, colesterol, cafeína vitaminas, pigmentos, sustancias fluorescentes, agente anticáncer, toxina, enzimas, sustancia radiactiva, biotina y similares. Para dichas
25 alteraciones, ver, por ejemplo, patentes US 5,660,985 y 5,756,703.

El aptámero de la presente invención se puede sintetizar como se describe en la presente y por un método conocido per se en la técnica. Un método de síntesis

emplea ARN polimerasa. Un ADN que tiene una secuencia deseada y una secuencia promotora de ARN polimerasa se sintetiza químicamente, que a modo de templado, se transcribe por método conocido públicamente para obtener el ARN deseado. El aptámero de la presente invención también se puede sintetizar usando ADN polimerasa. Un ADN

5 que tiene una secuencia deseada se sintetiza químicamente, que a modo de templado, se amplifica por un método de conocimiento público conocido como la reacción en cadena de polimerasa (PCR). Este se convierte en monocatenario por un método conocido públicamente de la electroforesis de poliacrilamida o tratamiento enzimático. Cuando se sintetiza un aptámero modificado, se puede aumentar la eficiencia de la reacción de

10 elongación por medio de una polimerasa mutada en un sitio particular. El aptámero así obtenido se puede purificar fácilmente por un método conocido públicamente.

Un aptámero se puede sintetizar en grandes cantidades por métodos de síntesis química tales como el método de amidita y el método de fosforamidita. Estos métodos de síntesis son bien conocidos, como se describe Nucleic Acids (Vol,2) [1]

15 Synthesis and Analysis of Nucleic Acids (editado por Yukio Sugiura, publicado por Hirokawa Publishing Company) y similares. En la práctica, se usa un sintetizador tal como OligoPilot100 u OligoProcess (fabricado por GE Healthcare Bioscience). El aptámero sintetizado de este modo se puede purificar por un método conocido per se tal como cromatografía.

20 Siempre y cuando que un grupo activo tal como un grupo amino se introduzca en un aptámero durante el proceso de síntesis química por el método de fosforamidita o similares, se puede añadir una sustancia funcional después de la síntesis. Por ejemplo, al introducir un grupo amino en un extremo del aptámero, es posible condensar una cadena de polietilenglicol que incorpora un grupo carboxilo.

25 Un aptámero se une a la molécula blanco en una amplia variedad de modos de unión, tales como uniones iónicas basadas en la carga negativa del grupo fosfato, uniones hidrófobas y uniones hidrógeno basadas en ribosa, y uniones hidrógeno e

interacción por apilamiento basado en las bases de ácido nucleico. En particular, las uniones iónicas basadas en la carga negativa del grupo fosfato, que están presentes en la misma cantidad que la cantidad de nucleótidos constituyentes, son fuertes y se unen a lisina y arginina que están presentes en la superficie de la carga positiva de la proteína.

- 5 Por esta razón, se pueden sustituir las bases de ácido nucleico no involucradas en la unión directa a la molécula blanco. En particular, debido a que la región de la estructura del tallo ya tiene pares de bases formados y se orienta hacia el interior de la estructura de doble hélice, es poco probable que las bases de ácido nucleico se unan directamente a la molécula blanco. En consecuencia, aun cuando se reemplaza un par de bases con otro
- 10 par de bases, la actividad del aptámero con frecuencia no disminuye. En las estructuras en donde no se forman pares de bases, tales como estructuras de lazo, siempre y cuando que la base de ácido nucleico no estén involucrados en la unión directa a la molécula blanco, es posible la sustitución de la base. Con respecto a las modificaciones de la posición 2' de ribosa, el grupo funcional de la posición 2' de ribosa con frecuencia
- 15 interactúa directamente con la molécula blanco, pero en muchos casos, no es de importancia, y pueden estar sustituidos con otra molécula modificada. En consecuencia, un aptámero, a menos que el grupo funcional involucrado en la unión directa a la molécula blanco esté sustituido o suprimido, a menudo retiene su actividad. También es importante que la estructura tridimensional total no cambie mucho.

- 20 Un aptámero se puede preparar por la utilización del método SELEX o una versión mejorada de esta (por ejemplo, Ellington et al., (1990) *Nature*, 346, 818-822; Tuerk et al., (1990) *Science*, 249, 505-510). En el método SELEX, al volver los criterios de selección más rigurosos por el aumento de la cantidad de rondas o usando una sustancia competidora, un aptámero que exhibe un mayor potencial de unión para la molécula
- 25 blanco se concentra y se selecciona. En consecuencia, por medio del ajuste de la cantidad de rondas de SELEX y/o el cambio de la condición competitiva, se pueden obtener aptámeros con diferentes fuerzas de unión, aptámeros con diferentes modos de

unión, y aptámeros con la misma fuerza de unión o modo de unión peor diferentes secuencias en algunos casos. El método SELEX comprende un proceso de amplificación por PCR; al producir una mutación por medio de iones de manganeso y similares en el proceso, es posible realizar SELEX con mayor diversidad.

5 Los aptámeros obtenidos por SELEX son ácidos nucleicos que exhiben alta afinidad para la molécula blanco, pero esto no significa inhibir una bioactividad de la molécula blanco. La quimasa es una proteína básica, a la que se considera que los ácidos nucleicos probablemente se unen en forma no específica pero los aptámeros diferentes de los que se unen fuertemente a un sitio particular de la quimasa no influyen en la
10 actividad de la molécula blanco. En efecto, el ARN que comprende una secuencia aleatoria usada como control negativo no inhibió la actividad enzimática de la quimasa, aunque se une débilmente a la quimasa.

 Sobre la base de un aptámero activo seleccionada de este modo, se puede realizar SELEX para adquirir un aptámero que posee mayor actividad. En forma
15 específica, después de preparar un molde en donde un aptámero con una secuencia determinada se aleatoriza parcialmente o un molde se dopa con aproximadamente 10 a 30% de las secuencias aleatorias, se realiza SELEX nuevamente.

 Un aptámero obtenido por SELEX tiene una longitud de aproximadamente 80 nucleótidos, y es difícil preparar un agente farmacéutico como tal. Por lo tanto, es
20 necesario repetir esfuerzos de prueba y error para acortar el aptámero a una longitud de aproximadamente 50 nucleótidos o menos que permite facilitar la síntesis química. De acuerdo con el diseño del cebador para un aptámero obtenido por SELEX, se modifica la facilidad de la posterior operación de minimización. A menos que el cebador se diseñe con éxito, el posterior desarrollo será imposible incluso si el aptámero con actividad se
25 selecciona por SELEX. En la presente invención, se obtiene un aptámero que retiene actividad incluso con 23 nucleótidos.

 Los aptámeros se pueden modificar fácilmente porque permiten la síntesis

química. Para los aptámeros, por la predicción de la estructura secundaria usando el programa MFOLD o por la predicción de la estructura estérica por análisis de rayos X o análisis de RMN, es posible predecir en alguna medida qué nucleótido se puede sustituir o suprimir, y dónde insertar un nuevo nucleótido. Un aptámero predicho con la nueva
5 secuencia se puede sintetizar químicamente en forma sencilla, y se puede determinar si el aptámero retiene o no la actividad usando un sistema de ensayo existente.

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

Los expertos en la técnica pueden realizar una amplia variedad de diseño o alteraciones de modificaciones, como secuencias.

Como se indicó antes, los aptámeros permiten una amplia variedad de
15 diseño o alteraciones de modificaciones. La presente invención también proporciona un método de producción del aptámero que permite una amplia variedad de diseño o alteración de un aptámero que comprende una secuencia específica (por ejemplo, una secuencia que corresponde a una porción seleccionada entre las regiones del tallo, regiones del lazo internas, regiones de la protuberancia, regiones del bucle de la horquilla
20 y regiones de cadena simple: de aquí en adelante en la presente, abreviado como secuencia fija según corresponda).

Por ejemplo, el método de producción de dicho aptámero incluye la producción de un aptámero que comprende una secuencia fija por medio de una sola clase de molécula de ácido nucleico o una pluralidad de clases de moléculas de ácido
25 nucleico (por ejemplo, una biblioteca de moléculas de ácido nucleico con diferentes cantidades de "a" o "b") que consiste en una secuencia de nucleótidos mostrada por la fórmula:

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
5 unidades “a” de N; (N)b representa una cadena de nucleótidos que consiste en unidades
“b” de N; cada una de las unidades de N, sea idéntica o diferente, es un nucleótido
seleccionado del grupo que consiste en A, G, C, U y T (con 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, con preferencia 1 a aproximadamente 50, con
10 más preferencia 1 a aproximadamente 30, aún con más preferencia 1 a aproximadamente
20 o 1 a aproximadamente 10], y pares de cebadores que corresponden a las secuencias
del cebador (i) y (ii), respectivamente.

La presente invención también proporciona un complejo que comprende el
aptámero de la presente invención y una sustancia funcional unida a este. El enlace entre
15 el aptámero y la sustancia funcional del 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 uno o más (por ejemplo, 2 o 3)
de las sustancias funcionales de la misma clase o diferentes clases se unen entre sí. La
sustancia funcional no está particularmente limitada, siempre confiera nuevamente una
20 determinada función a un aptámero de la presente invención, o sea capaz de cambiar (por
ejemplo, aumentar) una determinada característica que pueda poseer un aptámero de la
presente invención. A modo de ejemplos de la sustancia funcional, se pueden mencionar
proteínas, péptidos, aminoácidos, lípidos, azúcares, monosacáridos, polinucleótidos, y
nucleótidos. A modo de ejemplos de la sustancia funcional, se pueden mencionar
25 sustancias de afinidad (por ejemplo, biotina, estreptavidina, polinucleótidos que poseen
afinidad para la secuencia complementaria blanco, anticuerpos, glutatión sefarosa,
histidina), sustancias para marcación (por ejemplo, sustancias fluorescentes, sustancias

luminescentes, radioisótopos), enzimas (por ejemplo, peroxidasa de rábano, fosfatasa alcalinas), vehículos de administración del fármaco (por ejemplo, liposoma, microesferas, péptidos, polietilenglicoles), fármacos (por ejemplo, los que se usan en la terapia de misiles tales como calicheamicina y duocarmicina; análogos de mostaza nitrogenada tales como ciclofosfamida, melfalan, ifosfamida o trofosfamida; etileniminas tales como tiotepa; nitrosoureas tales como carmustina; agentes alquilantes tales como temozolomida o dacarbazina; antagonistas metabólicos tipo folato tales como metotrexato o raltitrexed; análogos de purina tales como tioguanina, cladribina o fludarabina; análogos de pirimidina tales como fluorouracilo, tegafur o gemcitabina; alcaloides de la vinca tales como vinblastina, vincristina o vinorelbina y sus análogos; derivados de podofilotoxina tales como etopósido, taxanos, docetaxel o paclitaxel; antracilinas tales como doxorubicina, epirubicina, idarrubicina y mitoxantrona, y análogos de estos; otros antibióticos citotóxicos tales como bleomicina y mitomicina; compuestos de platino tales como cisplatino, carboplatino y oxaliplatino; pentostatina, miltefosina, estramustina, topotecano, irinotecano y bicalutamida), y toxinas (por ejemplo, toxina de ricina, liatoxina y toxina Vero). Estas moléculas funcionales se eliminan finalmente en algunos casos. Por otra parte, las moléculas pueden ser péptidos que pueden ser reconocidos y escindidos por enzimas tales como trombina, metaloproteinasa de matriz (MMP), y Factor X, y pueden ser polinucleótidos que pueden escindirse con nucleasas o endonucleasa de restricción.

El aptámero o el complejo de la presente invención se puede usar como, por ejemplo, un agente farmacéutico o un reactivo de diagnóstico, un reactivo o reactivos de ensayo.

El aptámero y el complejo de la presente invención pueden poseer una actividad para inhibir una función de la quimasa. Como se indicó antes, la quimasa se asocia profundamente con fibrosis y enfermedades cardiovasculares. En consecuencia, el aptámero y el complejo de la presente invención son útiles como agentes farmacéuticos para tratar o prevenir enfermedades acompañados por fibrosis o trastornos

cardiovasculares.

El aptámero y el complejo de la presente invención son capaces de unir específicamente a la quimasa. En consecuencia, el aptámero y el complejo de la presente invención son útiles como sondas para la detección de quimasa. Las sondas son útiles en
5 imágenes in vivo de la quimasa, mediciones de concentraciones sanguíneas de quimasa, tinción del tejido, ELISA y similares. Las sondas también son útiles como reactivos de diagnóstico, reactivos de ensayo, reactivos analíticos y similares para enfermedades involucradas por la quimasa (enfermedades acompañadas por fibrosis o trastornos cardiovasculares, y similares).

10 Sobre la base de su unión específica a la quimasa, el aptámero y el complejo de la presente invención se pueden usar como ligandos para la purificación de quimasa.

El aptámero y complejo de la presente invención se puede usar como vehículo de administración del fármacos.

15 Las enfermedades involucradas por la fibrosis orgánica o tisular incluye fibrosis pulmonar, hiperplasia prostática, fibrosis miocárdica, fibrosis musculoesquelética, mielofibrosis, histeromioma, escleroderma, adhesión después de la operaciones quirúrgicas, cicatrices posoperatorias, cicatrices de quemaduras, cicatrices hipertróficas, queloide, dermatitis atópica, esclerosis peritoneal, asma, cirrosis hepática, pancreatitis
20 crónica, cáncer gástrico cirroso, fibrosis hepática, fibrosis renal, enfermedades vasculares fibrosas, retinitis debida a microvasculitis fibrosa como complicación diabética, neurosis, nefropatías, glomerulonefritis, nefritis tubulointersticial, enfermedades renales hereditarias, arteritis periférica arteriosclerótica y similares.

Las enfermedades cardiovasculares incluyen angiopatías, aneurismas
25 aórticos, insuficiencia renal, hipertensión, arteriosclerosis, infarto de miocardio, hipertrofia cardíaca, falla cardíaca, restenosis después e angiopatías debido a angioplastia coronaria transluminal percutánea y similares, neuropatías diabéticas y no diabéticas, trastornos

circulatorios periféricos y similares.

La quimasa posee actividad enzimática y escinde sustancias bioactivas que pueden servir como sustratos. Los ejemplos de sustratos conocidos hasta la fecha incluyen AngI, TGF- β latente, SCF, procolágeno, procolagenasa, pro-MMP-9, precursor de IL-1 β y similares. La quimasa exhibe acciones biológicas, por medio de reacciones para la producción o degradación de estos péptidos bioactivos, que incluyen remodelación de la matriz celular, redes con citoquinas, inmunidad, y vasoconstricción. Mientras tanto, la quimasa misma actúa para activar los mastocitos y promover la liberación de histamina y se asocia estrechamente con la inflamación. En consecuencia, el aptámero y el complejo de la presente invención no se limitan a los sustratos descritos anteriormente y se pueden usar como agentes farmacéuticos o reactivos de diagnóstico, reactivos de ensayo, y reactivos analíticos para enfermedades relacionadas con las funciones biológicas mediadas por los sustratos aceptados por la quimasa y enfermedades involucradas con la quimasa misma.

El agente farmacéutico de la presente invención se puede formular con un portador farmacéuticamente aceptable. Como ejemplos del portador farmacéuticamente aceptable, se pueden mencionar excipientes tales como sacarosa, almidón, manitol, sorbitol, lactosa, glucosa, celulosa, talco, fosfato de calcio, y carbonato de calcio; aglutinantes tales como celulosa, metilcelulosa, hidroxilpropilcelulosa, polipropilpirrolidona, gelatina, goma arábica, polietilenglicol, sacarosa, y almidón; desintegrantes tales como almidón, carboximetilcelulosa, hidroxilpropilalmidón, almidón glicólico sódico, carbonato de hidrógeno sódico, fosfato de calcio, y citrato de calcio; lubricantes tales como estearato de magnesio, Aerosil, talco, y laurilsulfato de sodio; agentes saborizantes tales como ácido cítrico, mentol, sal de glicirrizina-amonio, glicina y polvo de naranja; conservantes tales como benzoato de sodio, sulfito de hidrógeno sódico, metilparabeno y propilparabeno; estabilizantes tales como ácido cítrico, citrato de sodio, y ácido acético; agentes de suspensión tales como metilcelulosa, polivinilpirrolidona, y estearato de

aluminio; agentes de dispersión tales como tensioactivos, diluyentes tales como agua, solución salina fisiológica, y jugo de naranja; ceras base tales como manteca de cacao, polietilenglicol, y querosén y similares, pero estos no son limitantes.

5 No existe limitación en la vía de administración del agente farmacéutico de la presente invención, que se puede administrar, por ejemplo, por administración oral y administración parenteral.

10 Las preparaciones adecuadas para la administración oral son una solución preparada por la disolución de una cantidad efectiva de ligando en un diluyente tal como agua, solución salina fisiológica, o jugo de naranja; cápsulas, sobrecitos o comprimidos que comprenden una cantidad efectiva de ligando en una forma sólida o granular; una suspensión preparada por la suspensión de una cantidad efectiva de ingrediente activo en un dispersante apropiado; una emulsión preparada por la dispersión y emulsión de una cantidad efectiva de ingrediente activo en un dispersante apropiado; C10, que promueve la absorción de sustancias hidrosolubles y similares.

15 El agente farmacéutico de la presente invención se puede recubrir por un método conocido per se para el fin de enmascarar el sabor, disolución entérica, liberación sostenida y similares, según corresponda. Como ejemplos de agentes de recubrimiento usados para la cubierta, se usan hidroxipropilmetilcelulosa, etilcelulosa, hidroximetilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, polioxietilenglicol, Tween 80, Pluronic F68, 20 acetato y ftalato de celulosa, ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa, succinato y acetato de hidroximetilcelulosa, Eudragit (fabricado por Rohm, Alemania, copolímero de ácido metacrílico/ácido acrílico), pigmentos (por ejemplo, óxido de hierro rojo, dióxido de titanio y similares) y similares. El agente farmacéutico puede ser una prepararon de liberación rápida o preparación de liberación sostenida.

25 Como preparaciones adecuadas para la administración parenteral (por ejemplo, administración intravenosa, administración subcutánea, administración intramuscular, administración tópica, administración intraperitoneal, administración

intranasal y similares), se dispone de líquidos inyectables estériles acuosos y no acuosos, que pueden comprender un antioxidante, una solución buffer, un agente bacteriostático, un agente de isotonicidad y similares. Las suspensiones estériles acuosas y no acuosas también se pueden mencionar, las que pueden comprender un agente de suspensión, un solubilizante, un espesante, un estabilizante, un antiséptico y similares. La preparación se puede incluir en un recipiente tal como una ampolla o un vial en un volumen de dosis unitario o en varias dosis divididas. Un ingrediente activo y un portador farmacéuticamente aceptable también se puede secar y congelar y conservar en un estado que se pueda disolver o suspender en un vehículo estéril apropiado inmediatamente antes de usar.

10 Las preparaciones de liberación sostenida también preparaciones adecuadas. Las formas de dosificación de las preparaciones de liberación sostenida incluyen liberación sostenida de vehículos o recipientes incluidos en el cuerpo, tales como huesos artificiales, bases biodegradables o esponjas no biodegradable, bolsas y similares. Los dispositivos para la administración continua o intermitente o tópica fuera del cuerpo, tales como bombas de fármaco y bombas de presión osmótica, también se incluyen en el alcance de las preparaciones de liberación sostenida. Las bases biodegradables incluyen liposomas, liposomas catiónicos, ácido poli(lactic-co-glicólico) (PLGA), aterocolágeno, gelatina, hidroxiapatita, polisacárido sizofirano.

Además de las inyecciones líquidas, suspensiones y preparaciones de liberación sostenida, son aceptables los inhalantes adecuados para administración transpulmonar, ungüentos adecuados para la administración percutánea, y similares.

En el caso de un inhalante, un ingrediente activo en estado liofilizado se microniza y administra por inhalación usando un dispositivo de inhalación apropiado. Un inhalante se puede formular según corresponda con un tensioactivo usado en forma convencional, aceite, sazónador, ciclodextrina o derivado de este según sea necesario. Un inhalante se puede producir de acuerdo con un método convencional. En forma específica, un inhalante se puede producir por la pulverización o licuefacción del aptámero

o complejo de la presente invención, combinación de estos en un propelente de inhalación y/o portador, y cargarlo en un recipiente de inhalación apropiado. Cuando el aptámero o el complejo de la presente invención anteriormente descritos es un polvo, se puede usar un inhalador de polvo mecánico común; en el caso de un líquido, se puede usar un inhalador tal como un nebulizador. En la presente, como propelente convencionalmente usado; se puede mencionar compuestos de la serie de clorfluorocarbono tales como clorfluorocarbono-11, clorfluorocarbono-12, clorfluorocarbono-21, clorfluorocarbono-22, clorfluorocarbono-113, clorfluorocarbono-114, clorfluorocarbono-123, clorfluorocarbono-142c, clorfluorocarbono-134a, clorfluorocarbono-227, clorfluorocarbono-C318, y 1,1,1,2-tetrafluoroetano, hidrocarburos tales como propano, isobutano, y n-butano, ésteres tales como éter dietílico, gases comprimidos tales como nitrógeno gaseoso y dióxido de carbono gaseoso y similares.

En la presente, se pueden mencionar como ejemplos del tensioactivo, ácido oleico, lecitina, dioleato de dietilenglicol, oleato de tetrahidroflurilo, oleato de etilo, miristato de isopropilo, trioleato de glicerilo, monolaurato de glicerilo, monoleato de glicerilo, monoestearato de glicerilo, monolisinoato de glicerilo, alcohol cetílico, alcohol estearílico, polietilenglicol 400, cloruro de cetilpiridinio, trioleato de sorbitano (nombre comercial Span 85), monoleato de sorbitano (nombre comercial Span 80), monolaurato de sorbitano (nombre comercial pan 20), aceite de ricino endurecido polioxietileno (nombre comercial HCO-60), monolaurato de polioxietileno (20) sorbitano (nombre comercial Tween 20), monoleato de polioxietileno (20) sorbitano (nombre comercial Tween 80), lecitina de origen de recurso natural (nombre comercial EPICLON), oleilpolioxietileno éter (2) (nombre comercial Brij 92), estearil polioxietileno (2) éter (nombre comercial Brij 72), lauril polioxietileno (4) éter (nombre comercial Brij 30), oleilpolioxietileno (2) éter (nombre comercial Genapol 0-020), copolímero en bloque de oxietileno y oxipropileno (nombre comercial Synperonic) y similares. Como ejemplos del aceite, se pueden mencionar 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 (vaselina amarilla, vaselina blanca, parafina, plastibase, silicona, ungüento blanco, cera de abejas, grasa de cerdo, aceites vegetales, ungüento hidrófilo, vaselina hidrófila, lanolina purificada, lanolina hidrolizada, ungüento absorbedor de agua, plastibase hidrófila, ungüento macrogol y similares) se combina con un aptámero de la presente invención, que es el ingrediente activo, y se usa como preparación.

La dosis del agente farmacéutico de la presente invención varía de acuerdo con la clase y actividad del ingrediente activo, la gravedad de la enfermedad, especie de animal que es el sujeto de administración, tolerabilidad al fármaco del sujeto de administración, peso corporal, edad y similares, y la dosis usual, basada en la cantidad de ingrediente activo por día por adulto, puede ser de aproximadamente 0.0001 a aproximadamente 100 mg/kg, por ejemplo, aproximadamente 0.0001 a aproximadamente 10 mg/kg, con preferencia aproximadamente 0.005 a aproximadamente 1 mg/kg.

La presente invención también proporciona un portador de fase sólida que tiene el aptámero y/o el complejo de la presente invención inmovilizados en este. Como ejemplos del portador de fase sólida, se pueden mencionar un sustrato, una resina, una placa (por ejemplo, placa multipocillo), un filtro, un cartucho, una columna y un material poroso. El sustrato puede ser uno usado en los chips de ADN, chips de proteína y similares; por ejemplo, se pueden mencionar, sustratos de níquel-PTFE (politetrafluoroetileno), sustratos de vidrio, sustratos de apatita, sustratos de silicona, sustratos de alúmina y similares, y sustratos preparados por el recubrimiento de estos sustratos con un polímero y similares. Como ejemplos de la resina, se pueden mencionar, partículas de agarosa, partículas de sílice, un copolímero de acrilamida y N,N'-metilenbisacrilamida, partículas de poliestireno-divenilbenceno entrecruzado, partículas de dextrano entrecruzado con epíclorohidrina, fibra de celulosa, polímeros entrecruzados de arildextrano y N,N'-metilenbisacrilamida, polímeros sintéticos monodispersados, polímeros hidrofílicos monodispersados, sefarosa, Toyopearl y similares, y también se incluyeron

resinas preparadas por la unión de varios grupos funcionales de estas resinas. El portador de fase sólida de la presente invención puede ser útil, por ejemplo, para purificar, detectar y cuantificar quimasa.

El aptámero y/o el complejo de la presente invención se pueden inmovilizar en un portador de fase sólida por un método conocido per se. Por ejemplo, se puede mencionar un método que introduce una sustancia de afinidad (por ejemplo, las descritas antes) o un grupo funcional predeterminado en el aptámero y/o el complejo de la presente invención, y luego inmovilizar el aptámero o complejo en un portador de fase sólida por medio de la sustancia de afinidad o grupo funcional predeterminado. La presente invención también proporciona dichos método. El grupo funcional predeterminado puede ser un grupo funcional que se puede someter a una reacción de acoplamiento; por ejemplo, se puede mencionar un grupo amino, un grupo tiol, un grupo hidroxilo, y un grupo carboxilo. La presente invención también proporciona un aptámero que tiene dicho grupo funcional introducido.

La presente invención también proporciona un método de purificar y concentrar quimasa. En particular, la presente invención hace posible separar quimasa de las proteínas de otras proteínas de la familia. El método de purificación y concentración de la presente invención puede comprender absorber quimasa en el portador de fase sólida de la presente invención, y eluir la quimasa adsorbida con un eluyente. La adsorción de quimasa al portador de fase sólida de la presente invención se puede obtener por un método conocido per se. Por ejemplo, una muestra que contiene quimasa (por ejemplo, cultivo bacteriana o celular o sobrenadante del cultivo, sangre) se introduce en el portador de fase sólida de la presente invención o una composición que contiene el mismo. La quimasa se puede eluir usando un eluyente tal como una solución neutra. No existe limitación sobre el eluyente neutro, que puede tener un pH de, por ejemplo, aproximadamente 6 a aproximadamente 9, con preferencia aproximadamente 6.5 a aproximadamente 8.5, y con más preferencia aproximadamente 7 a aproximadamente 8.

La solución neutra también puede comprender, por ejemplo, urea, un agente quelante (por ejemplo, EDTA), una sal de sodio (por ejemplo, NaCl), una sal de potasio (por ejemplo, KCl), una sal de magnesio (por ejemplo, $MgCl_2$), a tensioactivo (por ejemplo, Tween 20, Triton, NP40), y glicerina. El método de purificación y concentración de la presente invención también puede comprender lavar el portador de fase sólida usando una solución de lavado después de la adsorción de quimasa. Los ejemplos de la solución de lavado incluyen los que contienen urea, un agente quelante (por ejemplo, EDTA), Tris, un ácido, un álcali, ARN de transferencia, ADN, tensioactivos tales como Tween 20, sales tales como NaCl y similares. El método de purificación y concentración de la presente invención aun puede comprender también el calentamiento del portador de fase sólida. Esta etapa permite la regeneración y esterilización del portador de fase sólida.

La presente invención también proporciona un método de detectar y cuantificar quimasa. En particular, la presente invención hace posible detectar y cuantificar en forma separada de las proteínas de de otras familia de proteínas. El método de detección y cuantificación de la presente invención puede comprender medir quimasa por utilizar el aptámero de la presente invención (por ejemplo, por el uso del complejo y el portador de fase sólida de la presente invención). El método de detectar y cuantificar se puede realizar de la misma manera que un método inmunológico, excepto que el aptámero de la presente invención se usa en le lugar de un anticuerpo. En consecuencia, por medio del aptámero de la presente invención como una sonda en lugar de un anticuerpo, de la misma manera que métodos tales como enzimoimmunoensayo (EIA) (por ejemplo, ELISA competitivo directo, ELISA competitivo indirecto, ELISA sándwich), radioimmunoensayo (RIA), inmunoensayo fluorescente (FIA), técnica de transferencia Western, método de tinción inmunohistoquímico y método de separación celular, se puede realizar la detección y cuantificación. El aptámero de la presente invención también se puede usar como una sonda molecular para PET y similares. Estos métodos pueden ser útiles, por ejemplo, para medir los contenidos de quimasa en organismos vivos o

muestras biológicas, y para diagnosticar una enfermedad asociada con quimasa.

Las descripciones en todas las publicaciones mencionadas en la presente, que incluyen patentes y memorias descriptivas de patentes, se incorporan por referencia en la presente invención en la medida que todas ellas se hayan dado expresamente.

5 La presente invención se describe de aquí en adelante con más detalle por medio de los siguientes Ejemplos, que no obstante, nunca limitan el alcance de la invención.

EJEMPLOS

10

EJEMPLO 1

Preparación de los aptámeros de ARN que se unen específicamente a la quimasa (1)

Los aptámeros de ARN que se unen específicamente a la quimasa se prepararon usando el método SELEX. SELEX se realizó con las mejoras del método de Ellington et al. (Ellington and Szostak, Nature 346, 818-822, 1990) y el método de Tuerk et al. (Tuerk y Gold, Science 249, 505-510, 1990). La quimasa (Human Skin, fabricado por Calbiochem) inmovilizada en el portador de flujo rápido en Sefarosa 4 activado por NHS (fabricado por GE Healthcare) se usó como molécula blanco. La inmovilización de quimasa en el portador se realizó como se establece en las especificaciones de GE Healthcare. La cantidad inmovilizada se confirmó por el examen de la solución de quimasa antes de la inmovilización y el sobrenadante inmediatamente después de la inmovilización por SDS-PAGE. Como resultado del SDS-PAGE, no se detectó banda de quimasa en el sobrenadante; se confirmó que casi toda la quimasa usada se había acoplado. Esto significa que aproximadamente 167 pmol de quimasa se inmovilizaron en aproximadamente 3 μ L de la resina.

El ARN usado en la primera ronda (40N) se obtuvo por la transcripción de

un ADN sintetizado químicamente usando el kit de transcripción DuraScribe™ T7 (fabricado por Epicentre). El ARN obtenido por este método tiene la posición 2' de ribosa del nucleótido pirimidínico sustituida con fluoro. El siguiente ADN de 70 nucleótidos de largo, que tiene una secuencia del cebador en cada extremo de una secuencia aleatoria de 40 nucleótidos, se usó como templado de ADN. El templado de ADN y los cebadores usados se prepararon por síntesis química.

templado de ADN: 5'-
GCGGCCGCTCTTCTATGNN
NGAATTCCTACCGT-3' (SEQ ID NO: 1)

10 Cebador delantero: 5'-TAATACGACTCACTATAGGGACGGTAGGAATTC-
3' (SEQ ID NO: 2)

Cebador inverso: 5'-GCGGCCGCTCTTCTATG-3' (SEQ ID NO: 3)

Los N secuenciales del templado de ADN (SEQ ID NO: 1) son 40 nucleótidos en cualquier combinación (40N: cada N es A, G, C o T), lo que produce una
15 región de secuencia única para cada aptámero obtenida. El cebador delantero comprende una secuencia promotora de ARN polimerasa T7. La variación de la mezcla del ARN usada en la primera ronda fue teóricamente 10¹⁴.

La mezcla de ARN se añadió al portador inmovilizada a la quimasa, y dejo
20 decantar a temperatura ambiente durante 30 minutos. Luego, para eliminar el ARN no unido a la quimasa, la resina se lavó con la solución A. En la presente, la solución A fue una solución mixta de 145 mM de cloruro de sodio, 5.4 mM de cloruro de potasio, 1.8 mM de cloruro de calcio, 0.8 mM de cloruro de magnesio, y 20 mM de Tris. El ARN unido a quimasa se calentó a 95°C durante 10 minutos con la adición de solución B como un eluyente y se recuperó del sobrenadante. En la presente, la solución B fue una mezcla de
25 7 M de urea, 3 mM de EDTA, y 100 mM de Tris-HCl (pH 6.6). El ARN recuperado se amplificó por RT-PCR y se transcribió usando el kit de transcripción DuraScribe™ T7, y este se usó como la mezcla para la próxima ronda. Con este procedimiento tomada como

ronda 1, se realizó la misma operación múltiples veces. Después de completar el SELEX, el producto de PCR se clonó en el vector pGEM-T Easy (fabricado por Promega), y la cepa de *Escherichia coli* DH5 α (fabricado por Toyobo) se transformó con ella. Después de extraer el plásmido de una colonia única, las secuencias de bases de los clones se determinaron usando un secuenciador de ADN (3130xl Genetic Analyzer, fabricado por ABI).

Después de 8 rondas de SELEX, las secuencias de 44 clones se secuenciaron; se observó convergencia de secuencias. Las secuencias de algunos de los clones se muestran en la SEQ ID NO: 4-20. Entre las secuencias, existieron 6 secuencias que se muestran en SEQ ID NO: 4, 2 secuencias mostradas por la SEQ ID NO: 5, y 1 secuencia mostrada por la SEQ ID NO: 6-20. Las SEQ ID NO: 6 y 8 difirieron en una base sola. Se halló que las secuencias de SEQ ID NO: 4, 13, y 14 contienen la secuencia común mostrada por la SEQ ID NO: 21, que estaba presente en 9 de los 44 clones. Las estructuras secundarias de estas secuencias se predijeron usando el programa MFOLD (M. Zuker, *Nucleic Acids Res.* 31(13), 3406-3415, 2003); las porciones formadas por la porción de la secuencia común tenía una estructura del bucle similar. Las estructuras secundarias putativas de los aptámeros de las secuencias mostradas por las SEQ ID NO: 4, 5, 12-14, y 18 se dan en la Fig. 1, en donde cada porción formada por la secuencia común mostrada por la SEQ ID NO: 21 está encerrada en un círculo.

A continuación se dan las respectivas secuencias de nucleótidos. A menos que se indique de otro modo, las siguientes secuencias individuales se muestran en la dirección de 5' a 3', con las bases puricas (A y G) que están en la forma 2'-OH, y las bases pirimidínicas (U y C) en la forma modificada con 2'-fluoro. En las secuencias, cada uno de N₁ y N₂ indica cualquier nucleótido de A, G, C, y U, y X₁ y X₂ son ambos A o ambos G.

5

10

15

20

SEQ ID NO: 4:
GGGACGGUAGGAAUUCGUCCAUUCUACAGAUAGAGAUAAAGUAG
AAUUUAACAAAACAUAGAAGAGCGGCCGC
SEQ ID NO: 5:
GGGACGGUAGGAAUUCCACUUGUCUUUGAGGCAAGAAAUUGUA
UUCCGAAGAAGCAUAGAAGAGCGGCCGC
SEQ ID NO: 6:
GGGACGGUAGGAAUUCUACGGUCUGUGUGAAAUUGAAACACACA
AAGAACAAUAGACAUAGAAGAGCGGCCGC
SEQ ID NO: 7:
GGGACGGUAGGAAUUCACCUUUCCAAUUGUGAAAGAAACACAAAA
AGAAAUUGACAUCAUAGAAGAGCGGCCGC
SEQ ID NO: 8:
GGGACGGUAGGAAUUCUACGGUCUGUGUGAAAUUGAAACACACA
AAGAACAAUAAACAUAGAAGAGCGGCCGC
SEQ ID NO: 9:
GGGACGGUAGGAAUUCCCGAAAAGCAACAAGCUUGC UAAAAUGA
UUCCGAAAAAACACAUAGAAGAGCGGCCGC
SEQ ID NO: 10:
GGGACGGUAGGAAUUCGCGCGCCUAAAAAACGACGAU AUUACAG
AAACGUCAAAUACA UAGAAGAGCGGCCGC

5

10

15

20

SEQ ID NO: 11: GGGACGGUAGGAAUUCCCGACACGAAAUGUGUGAUUAAUUCCGA ACAACAAAGUAACAUAGAAGAGCGGCCGC
SEQ ID NO: 12: GGGACGGUAGGAAUUCGCCGUCAACGUUACAUAUGUAUAUACC AGGGUAACUAAACAUAGAAGAGCGGCCGC
SEQ ID NO: 13: GGGACGGUAGGAAUUCCGCAACCAUCCCGUAACUAUGGUUAGAU AGAGUUAAAAACCAUAGAAGAGCGGCCGC
SEQ ID NO: 14: GGGACGGUAGGAAUUCUCGUUCCUGACAGCAUUUGAGAUAGAUU UAAACAAACGCACAUAGAAGAGCGGCCGC
SEQ ID NO: 15: GGGACGGUAGGAAUUCCCAGAAAAUAAAUUCCGAAGAAAACAACAAU UUUUGCAAACAUAGAAGAGCGGCCGC
SEQ ID NO: 16: GGGACGGUAGGAAUUCCCAUGACUGAAAAACGUCAGUAAAAUCCGA AAAUCAUAUCAUAGAAGAGCGGCCGC
SEQ ID NO: 17: GGGACGGUAGGAAUUCCGUUCGCAGAAACGAACUUUUAAAAAUGU ACGUGGGAGCACAUAGAAGAGCGGCCGC

5	SEQ ID NO: 18: GGGACGGUAGGAAUUCGAACGACAAUUAUAGAACUUCGUUUGAC AUUCCACACCACAUAGAAGAGCGGCCGC
	SEQ ID NO: 19: GGGACGGUAGGAAUUCCACUGCAAUUCAGCAGAAAAAUUCCGA AAACACACACCAUAGAAGAGCGGCCGC
	SEQ ID NO: 20: GGGACGGUAGGAAUUCAAAAUCAGCUGAUUUGUAAUUUUUUUACA CAGGCAAAACACAUAGAAGAGCGGCCGC
10	SEQ ID NO: 21: $X_1GAUAGAN_1N_2UAAX_2$

Después de las 8 rondas descriptas anteriormente, el SELEX continuó en condiciones similares. Después de completar la 11va ronda, las secuencias de 93 clones se secuenciaron. Algunas de las secuencias de los clones se muestran en la SEQ ID NO: 22-27. Numerosas secuencias fueron idénticas a algunas de las secuencias obtenidas después de las 8 rondas; existieron 22 secuencias mostradas por la SEQ ID NO: 4 y 4 secuencias mostradas por la SEQ ID NO: 14. Esto significa que la secuencia común mostrada por la SEQ ID NO: 21 estaba concentrada. También existió 1 secuencia mostrada por la SEQ ID NO: 5, 3 secuencias mostradas por la SEQ ID NO: 22, y 2 secuencias mostradas por la SEQ ID NO: 23 y 24. Una secuencia fue mostrada por la SEQ ID NO: 25-27. Las SEQ ID NO: 22 y 11 difirieron en una basé sola. Las SEQ ID NO: 26 y 4 difirieron en una base sola. La secuencia común mostrada por la SEQ ID NO: 21 estuvo presente en 35 de 93 clones. De las secuencias que aparecieron recientemente por la 11va ronda, las que se muestran en las SEQ ID NO: 25 y 26 contenían la secuencia común mostrada por la SEQ ID NO: 21. Las estructuras secundarias putativas de los aptámeros de las secuencias mostradas por la SEQ ID NO: 22-27 se dan en la Fig. 2, en

donde cada porción formada por la secuencia común mostrada por la SEQ ID NO: 21 está rodeada por un círculo. Todas estas porciones tenían una estructura de bucle característica, como en la Fig. 1.

5 A continuación se dan las secuencias de nucleótidos respectivas. A menos que se indique lo contrario, las siguientes secuencias individuales se muestran en la dirección de 5' a 3', con las bases púricas (A y G) que están en la forma 2'-OH, y las bases pirimidínicas (U y C) en la forma modificada 2'-fluoro.

10	SEQ ID NO: 22: GGGACGGUAGGAAUCCCGACACAAAUGUGUGAUUAAUCCGAACAAC AAAGUAACAUAGAAGAGCGGCCGC
15	SEQ ID NO: 23: GGGACGGUAGGAAUUCAUAUGUACUCCGUCCUGACAAAUGUCA AUGAC AAACGUUCAUAGAAGAGCGGCCGC
	SEQ ID NO: 24: GGGACGGUAGGAAUCCCUUCAUAGUAGAAUGUUGGUUUCUACAAAAGC GACAAGCAUAGAAGAGCGGCCGC

5

10

SEQ ID NO: 25: GGGACGGUAGGAAUUCAGCUGACUCCAAUGCACACGUAGAUAGAGU UAAAACGUUGCAUAGAAGAGCGGCCGC
SEQ ID NO: 26: GGGACGGUAGGAAUUCGUCGAUUCUACAGAUAGAGAUAAAGUAGAA UUUAACAAAACAUAGAAGAGCGGCCGC
SEQ ID NO: 27: GGGACGGUAGGAAUUCGUCAUUCGGUUGCAAUUGAAAAUACAAA ACAAGGACAACCAUAGAAGAGCGGCCGC

Después de las 8 rondas de SELEX anteriormente descritas, SELEX continuó usando quimasa (Human Skin, fabricado por Calbiochem), inmovilizada en portador de flujo rápido Sefarosa 6 heparina (fabricado por GE Healthcare), como molécula blanco. La quimasa en solución se añadió al portador y se mantuvo a temperatura ambiente durante 30 minutos, por medio del cual la quimasa se inmovilizó al portador. La cantidad inmovilizada se revisó al examinar la solución de quimasa antes de la inmovilización y el sobrenadante inmediatamente después de la inmovilización por SDS-PAGE. Los resultados del SDS-PAGE no detectaron banda de quimasa en el sobrenadante, lo que confirma que se inmovilizó casi toda la quimasa usada. Fue evidente que aproximadamente 100 pmol de quimasa se inmovilizaron a aproximadamente 3 µL de la resina.

La mezcla de la 11va ronda se clonó, y se determinaron las secuencias de 79 clones. Las secuencias de algunos de estos clones se muestran en la SEQ ID NO: 28-34. Hubo numerosas secuencias idénticas a las secuencias obtenidas después de las 8 rondas anteriormente descritas; existieron 9 secuencias mostradas por la SEQ ID NO: 4 y 1 secuencia mostrada por la SEQ ID NO: 19. Hubo numerosas secuencias idénticas a

las secuencias obtenidas después de las 11 rondas anteriormente descritas; existieron 2 secuencias mostradas por la SEQ ID NO: 27. En forma adicional, existieron 4 secuencias mostrada por la SEQ ID NO: 28, 2 secuencias mostrada por la SEQ ID NO: 29, y 1 secuencia mostrada por la SEQ ID NO: 30-34. Las SEQ ID NO: 30 y 31 difirieron en una base sola. La SEQ ID NO: 32 es una secuencia resultante de la supresión de una base de la SEQ ID NO: 31. La secuencia común mostrada por la SEQ ID NO: 21 estaba presente en 14 de los 79 clones. De las secuencias que aparecieron recientemente en la 11va ronda, se halló que las SEQ ID NO: 30-32 y 34 comprenden la secuencia común mostrada por la SEQ ID NO: 21. Las estructuras secundarias putativas de los aptámeros de las secuencias mostrada por la SEQ ID NO: 28-34 se dan en la Fig. 3, en donde cada porción formada por la secuencia común mostrada por la SEQ ID NO: 21 está rodeada por un círculo. Todas estas porciones, excepto en el clon mostrado por la SEQ ID NO: 34, tenían una estructura de bucle característica, como en la Fig. 1.

A continuación se dan las secuencias de nucleótidos mostradas por la SEQ ID NO: 28-34, respectivamente. A menos que se indique lo contrario, las siguientes secuencias individuales se muestran en la dirección de 5' a 3', con las bases púricas (A y G) que están en la forma 2'-OH, y las bases pirimidínicas (U y C) en la forma modificada 2'-fluoro.

5

10

15

20

SEQ ID NO: 28:
GGGACGGUAGGAAUUCAAUUUCUUUCUAUUCUCACCUGAGUAUAUCAGG
CACAGUACAUAGAAGAGCGGCCGC
SEQ ID NO: 29:
GGGACGGUAGGAAUUCACGACCGCCCCAAAAAUGGUGACAUUUUAGAAA
CACCGAACAUAGAAGAGCGGCCGC
SEQ ID NO: 30:
GGGACGGUAGGAAUUCGUCCCUCUUGUCUAUUUUGCAGAUAGACUUAAA
GCAAACAUAGAAGAGCGGCCGC
SEQ ID NO: 31:
GGGACGGUAGGAAUUCGUCCCUCAUGUCUAUUUUGCAGAUAGACUUAAA
GCAAACAUAGAAGAGCGGCCGC
SEQ ID NO: 32:
GGGACGGUAGGAAUUCGUCCUCAUGUCUAUUUUGCAGAUAGACUUAAG
CAAACAUAGAAGAGCGGCCGC
SEQ ID NO: 33:
GGGACGGUAGGAAUUCUGUCUUUUCCACGCAACAAAUACAGAGCUU
UGCAAAACAUAGAAGAGCGGCCGC
SEQ ID NO: 34:
GGGACGGUAGGAAUUCUGCCGCAACCCAAUGAAAACGAAGAUAGAGAU
AAUCGAACAUAGAAGAGCGGCCGC

25 Las actividades de unión contra quimasa de los ácidos nucleicos mostrados por la SEQ ID NO: 4-20 y 22-34 se determinaron por el método de resonancia del plasmón superficial usando Biacore T100 (fabricado por GE Healthcare). El chip sensor usado fue el chip SA, que tenía estreptavidina inmovilizada en ella. A este se unieron

aproximadamente 1500 RU de un polidT de 16 nucleótidos con biotina unida en el extremo 5' de este. El ácido nucleico del ligando tenía un poliA de 16 nucleótidos añadido en el extremo 3' de este, y se inmovilizó al chip de SA por el apareamiento entre T y A. Se inyectaron 20 μ L de cada ácido nucleico con una velocidad de flujo de 20 μ L/min, y se inmovilizaron aproximadamente 1000 RU de ácido nucleico. Se inyectaron 20 μ L de quimasa para analito, preparada a 0.2 μ M. La solución A se usó como buffer de corrida.

Se halló que todas las secuencias examinadas se unen a la quimasa (Cuadro 1). Sin embargo, también se halló que la combinación de ácidos nucleicos (40N) usado en la 1ra ronda, que contenían una secuencia aleatoria de 40 nucleótidos que actúa como control negativo, exhibe actividad de unión débil contra la quimasa. En consecuencia, en el cuadro 1, los aptámeros con mayor actividad de unión que 40 N se representan con ++, y los que tienen actividad de unión equivalente en comparación con la de 40N se representan con y +. Un sensograma que muestra cómo los aptámeros mostrados por la SEQ ID NO: 12 y 13 se unen a la quimasa se da en la Fig. 4.

Independientemente de si la secuencia común mostrada por la SEQ ID NO: 21 estaba presente o ausente, algunas secuencias exhibieron actividad de unión superior que 40N, y otros exhibieron actividad de unión equivalente en comparación con 40N. Las SEQ ID NO: 4, 13, 14, 25, 26, y 30, que comprenden esta secuencia común, exhibieron actividad de unión superior que 40N, mientras que las SEQ ID NO: 31, 32, y 34, que comprenden la misma secuencia común, exhibieron actividad de unión equivalente en comparación con 40N. Se halló que los N_1N_2 contenidos en la secuencia de SEQ ID NO: 21 pueden ser GA, GU, UU, o CU, y que los X_1 y X_2 contenidos en la secuencia de la SEQ ID NO: 21 pueden ser ambos A.

CUADRO 1

SEQ ID NO:	Longitud	Actividad de unión determinada mediante Biacore
4	73	++
5	72	++
6	73	++
7	73	++
8	73	++
9	74	++
10	73	++
11	73	++
12	73	++
13	73	++
14	73	++
15	73	++
16	72	++
17	74	++
18	73	++
19	73	++

5

10

5

10

20	73	+
22	73	+
23	73	++
24	72	++
25	73	++
26	73	++
27	73	++
28	73	+
29	73	++
30	71	++
31	71	+
32	70	+
33	73	+
34	73	+

15

CUADRO 1

Actividad de unión para quimasa

20

“++” representa una secuencia que se une a la quimasa en forma significativamente más fuerte que el control negativo 40N. “+” representa una secuencia que se une a quimasa en forma equivalente en comparación con el control negativo 40N.

En la presente, 40N representa la combinación de ácidos nucleicos usada en la 1ra ronda, que comprende una secuencia aleatoria de 40 nucleótidos.

Preparación de los aptámeros de ARN que se unen específicamente a quimasa (2)

La mezcla de ARN se añadió al portador con quimasa inmovilizada en este, y se mantuvo a temperatura ambiente durante 30 minutos, después de lo cual la resina se lavó con solución C para eliminar el ARN no unido a la quimasa. En la presente, la solución C fue una solución mixta de 145 mM de cloruro de sodio, 5.4 mM de cloruro de potasio, 1.8 mM de cloruro de calcio, 0.8 mM de cloruro de magnesio, 20 mM de Tris (pH 7.6), y 0.05% de Tween 20. El ARN unido a la quimasa se recuperó por el añadido de la

solución D como eluyente y la agitación de la mezcla a temperatura ambiente durante 10 minutos. En la presente, la solución D se preparó por el añadido de clorhidrato de guanidina 6 M a la solución C para obtener un pH de 7.6. La elución se realizó en 3 ciclos. El ARN recuperado se amplificó por RT-PCR, y se transfirió usando el kit de transcripción

5 DuraScribe™ T7 para usar como una mezcla en la próxima ronda. Cada ronda de estas etapas se repitió una pluralidad de veces. Después de completar el SELEX, el producto de PCR se clonó en el vector pGEM-T Easy (fabricado por Promega), y la cepa de *Escherichia coli* strain DH5α (fabricado por Toyobo) se transformó con este. Después se extrajo el plásmido de una sola colonia, los clones se secuenciaron usando un

10 secuenciador de ADN (3130xl Genetic Analyzer, fabricado por ABI).

Después de completar 8 rondas de SELEX, se determinaron las secuencias; no se observó convergencia de secuencia. En consecuencia, se añadieron 2 mg/mL de heparina como agente de competición y el SELEX continuó hasta la ronda 11va. Las secuencias de 40 clones se determinaron, y se observó convergencia; se halló

15 que las secuencias de los 40 clones contienen la secuencia común mostrada por la SEQ ID NO: 21. Las secuencias de algunos de estos clones se muestran en la SEQ ID NO: 38-48. Existieron 6 secuencias mostradas por la SEQ ID NO: 38, 2 secuencias mostrada por la SEQ ID NO: 39, y 1 secuencia mostrada por la SEQ ID NO: 40-48.

Las estructuras secundarias putativas de los aptámeros de las secuencias mostrada por la SEQ ID NO: 38-40, 43, y 48 se dan en la Fig. 5, en donde cada porción formada por la secuencia común mostrada por la SEQ ID NO: 21 está rodeada por un círculo. En muchas de estas porciones, la secuencia común mostrada por la SEQ ID NO: 21 formó una estructura de bucle característica similar a la que se muestra en la Fig. 1.

20

A continuación se dan las secuencias de nucleótidos mostradas por la SEQ ID NO: 38-48, respectivamente. A menos que se indique lo contrario, las siguientes secuencias individuales se muestran en la dirección de 5' a 3', con las bases púricas (A y G) que están en la forma 2'-OH, y las bases pirimidínicas (U y C) en la forma modificada

25

2'-fluoro.

5

10

15

20

SEQ ID NO: 38:
GGGAGCAGGAGAGAGGUCAGAUGGAUAGAGUUAAGAUCUGGCU
GGCGCAUUAGCCUAUGCGUGCUAGUGUGA
SEQ ID NO: 39:
GGGAGCAGGAGAGAGGUCAGAUGGUUACGGAUAGAGUUAAGGU
AACGGUACGGCCUAUGCGUGCUAGUGUGA
SEQ ID NO: 40:
GGGAGCAGGAGAGAGGUCAGAUGAACGGAUAGAGCUAAGAGUU
CGUCAGAGGGGCCUAUGCGUGCUAGUGUGA
SEQ ID NO: 41:
GGGAGCAGGAGAGAGGUCAGAUGGUGAGAUAGAGUUAACACC
ACAAUAGUAGCCUAUGCGUGCUAGUGUGA
SEQ ID NO: 42:
GGGAGCAGGAGAGAGGUCAGAUGCGUGAUCGUGCAAGGCGGAU
AGAGUUAAGGCCUAUGCGUGCUAGUGUGA
SEQ ID NO: 43:
GGGAGCAGGAGAGAGGUCAGAUGCAAGCAAGAUAGAUUUAAAUG
GCGUUUGGGCCUAUGCGUGCUAGUGUGA
SEQ ID NO: 44:
GGGAGCAGGAGAGAGGUCAGAUGUUAGACCAAAGCAUAGGAGA
UAGAGUUAACCUAUGCGUGCUAGUGUGA

5	SEQ ID NO: 45:
	GGGAGCAGGAGAGAGGUCAGAUGGACCACCGAUGGGCAAGAUAGAG UUAAAUGCCUAUGCGUGCUAGUGUGA
	SEQ ID NO: 46:
	GGGAGCAGGAGAGAGGUCAGAUGGGACAGAUAGAGUUAAAGUCCGU UACGUGGCCUAUGCGUGCUAGUGUGA
10	SEQ ID NO: 47:
	GGGAGCAGGAGAGAGGUCAGAUGGUGAUAGAUAGAGUUAAAUCGC UGAAUGGCCUAUGCGUGCUAGUGUGA
	SEQ ID NO: 48:
	GGGAGCAGGAGAGAGGUCAGAUGUGAAGAUAGAGAUAAAUCACUA CAGUCGGCCUAUGCGUGCUAGUGUGA

15 Las actividades de unión contra quimasa de los ácidos nucleicos mostrados por la SEQ ID NO: 38-48 se evaluaron por el método de resonancia del plasmón superficial. En las evaluaciones de las SEQ ID NO: 38-48, se tomaron mediciones de la misma manera que en el Ejemplo 1. La solución C se usó como buffer de corrida. Los resultados de las mediciones se muestran en el cuadro 2.

20 Los ácidos nucleicos mostrados por la SEQ ID NO: 38-48 se identificaron como aptámeros que se unen a quimasa en forma significativamente más potente que 30N. Se halló que los X_1 y X_2 contenidos en la secuencia común de SEQ ID NO: 21 pueden ser ambos A o ambos G, y que los N_1N_2 contenidos en la secuencia común pueden ser GU, GC, GA, o UU.

CUADRO 2

SEQ ID NO:	Longitud	Actividad de unión determinada mediante Blacore
38	72	++
39	72	++
40	73	++
41	72	++
42	72	++
43	72	++
44	72	++
45	72	++
46	72	++
47	72	++
48	72	++

CUADRO 2

Actividad de unión para quimasa

“++” indica una secuencia que se une quimasa en forma significativamente más fuerte que el control negativo 30N. Aquí, 30N representa la combinación de ácidos nucleicos usados en la 1ra ronda, que comprende una secuencia aleatoria de 30 nucleótidos.

EJEMPLO 3

Determinación de la actividad inhibidora de quimasa usando sustrato sintético

Se determinó si los ácidos nucleicos mostrados por la SEQ ID NO: 4-20, 22-34, y 38-48 inhiben la actividad enzimática de la quimasa como se describe a continuación. El sustrato de quimasa usado fue Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-MCA (fabricado por Peptide Institute, Inc.), que contiene el péptido de 4 aminoácidos Ala-Ala-Pro-Phe, un

sustrato estándar para las proteasas tipo quimotripsina. Aquí, Suc es un grupo succinilo protector, y MCA es un grupo 4-metilcumaril-7-amida; después de la escisión de la parte C-terminal de la fenilalanina, se libera AMC (7-amino-4-metilcumarina). Por la detección de la fluorescencia de esta AMC, se puede determinar la actividad enzimática de la quimasa. El ensayo se realizó usando una placa de 96 pocillos (F16 Black Maxisorp Fluoronunc, fabricada por Nunc), con un volumen de la mezcla de reacción de 100 μL , en la solución C como solución buffer. Primero, cada ácido nucleico se diluyó en forma seriada a concentraciones de 0.0027-2 μM en la solución C para obtener soluciones de 50 μL . Después 10 μL del sustrato 1 mM sustrato preparado en la solución C se añadió a este, la placa se ajustó al lector de microplaca SpectraMax190 (fabricado por Molecular Devices Corporation), y se incubó a 37 °C durante 5 minutos. De forma separada, 0.05 μg (o 0.005 μg) de quimasa (recombinante, fabricado por SIGMA) se diluyó en solución C para obtener 40 μL de solución de quimasa, y se incubó a 37°C durante 5 minutos. La solución de quimasa se añadió a la mezcla del ácido nucleico y el sustrato para iniciar una reacción enzimática. La concentración de quimasa final en la mezcla de reacción fue 16.7 nM (o 1.67 nM), la concentración de sustrato final es 100 μM . La placa que contiene la mezcla de reacción se ajustó al lector de microplaca SpectraMax190 (fabricado por Molecular Devices Corporation), y se examinaron los cambios dependientes del tiempo en la intensidad de fluorescencia a 37°C durante 5 minutos (o 30 minutos) (longitud de excitación 380 nm, longitud de detección 460 nm). Una aproximación lineal del aumento de la fluorescencia de la AMC liberada del sustrato fue generada por la actividad de quimasa, y se tomó su pendiente como la velocidad inicial ($\dot{V}_{\text{max}}$). Para control, las muestras se trataron y analizaron de la misma manera en dos casos: uso de 30N o 40N (una combinación de ácidos nucleicos del nucleótido de 30 o 40 bases consecutivas representadas por N; N es A, G, C o T) (control negativo), y uso de quimostatina, un inhibidor de serina proteasa tipo quimotripsina conocido (control positivo). Tomando la

velocidad de reacción inicial sin el ácido nucleico y el inhibidor (V_0) como 100% de actividad enzimática, la tasa inhibitoria de cada sustancia de ensayo se calculó usando la siguiente ecuación:

Tasa inhibitora (%)=(1- V_{max}/V_0)×100

5

Se determinó la concentración inhibitora necesaria para causar un 50% de inhibición de la actividad enzimática (IC_{50}). Los resultados se muestran en el cuadro 3.

10

15

20

SEQ ID NO:	IC_{50} [μM]	SEQ ID NO:	IC_{50} [μM]
4	0.049±0.003	25	0.079±0.028
5	0.080±0.039	26	0.106±0.004
6	0.456±0.261	27	>0.5
7	>0.5	28	0.045±0.004
8	0.453±0.463	29	>0.5
9	0.273±0.069	30	0.147±0.044
10	>0.5	31	0.155±0.039
11	0.145±0.038	32	0.235±0.055
12	0.128±0.023	33	0.145±0.088
13	0.058±0.024	34	0.137±0.009
14	0.061±0.053	38	0.050±0.012
15	0.285±0.021	40	0.140±0.085
16	>0.5	41	0.060±0.017
17	0.092±0.042	42	0.124±0.026
18	0.058±0.021	43	0.081±0.050
19	0.163±0.001	44	0.049±0.013
20	0.282±0.013	45	0.074±0.011
22	0.105±0.009	46	0.038±0.004
23	0.238±0.060	47	0.058±0.012
24	0.092±0.003	48	0.095±0.018

CUADRO 3

Actividad inhibitora contra quimasa (IC_{50})

">0.5" indica que no se observó actividad inhibitora en el rango de concentración hasta 0.5 μM. Cada valor de IC_{50} es un valor promedio para 2 a 3 mediciones.

25

El control negativo 30N o 40N no exhibió actividad inhibidora ($IC_{50} > 0.5 \mu M$).

El control positivo quimostatina exhibió valores de IC_{50} de $0.1 \mu M$ - $0.2 \mu M$.

En síntesis, muchos de los aptámeros listados en el cuadro 3 exhibieron actividad inhibidora contra quimasa. Los aptámeros que exhibieron valores de IC_{50} de $0.1 \mu M$ o menos, en particular, se pueden considerar que tienen un excelente efecto inhibidor. Todos los aptámeros que comprenden la secuencia común mostrada por la SEQ ID NO: 21 exhibieron actividad inhibidora. Estos hallazgos demuestran que los X_1 y X_2 contenidos en la secuencia común pueden ser ambos A o ambos G, y que los N_1N_2 pueden ser cualquiera de GA, GU, GC, UU, y CU.

10

EJEMPLO 4

Truncamiento del aptámero

Los aptámeros mostrados por las SEQ ID NO: 4, 12, 13, y 14 se acortaron.

15 Los aptámeros mostrados por las SEQ ID NO: 4, 13, y 14 comprenden la secuencia común mostrada por la SEQ ID NO: 21. La SEQ ID NO: 12 es un aptámero que no comprende esta secuencia común. Las secuencias de aptámeros acortados se muestran en las SEQ ID NO: 49-57. Las estructuras secundarias putativas de los aptámeros mostrados por la SEQ ID NO: 49, 51, y 55-57 se dan en la Fig. 6, en donde cada porción formada por la secuencia común mostrada por la SEQ ID NO: 21 está rodeada por un círculo.

20 A continuación se dan las secuencias de nucleótidos mostradas por la SEQ ID NO: 49-57, respectivamente. A menos que se indique lo contrario, las siguientes secuencias individuales se muestran en la dirección de 5' a 3', con las bases púricas (A y G) que están en la forma 2'-OH, y las bases pirimidínicas (U y C) en la forma modificada 2'-fluoro.

25

5

SEQ ID NO: 49:
(una secuencia preparada por el acortamiento del clon mostrado por la SEQ
ID NO: 4 a una longitud de 29 nucleótidos que incluye la secuencia común)
GGUUCUACAGAUAGAGAUAAAGUAGAACC

10

SEQ ID NO: 50:
(una secuencia preparada por el acortamiento del clon mostrado por la SEQ
ID NO: 4 a una longitud de 35 nucleótidos que incluye la secuencia común)
GGCAUUCUACAGAUAGAGAUAAAGUAGAAUUUAAC

15

SEQ ID NO: 51:
(una secuencia preparada por el acortamiento del clon mostrado por la SEQ
ID NO: 12 a una longitud de 45 nucleótidos)
CGUUACAUAAUGUAUAUACCAGGGUAAACUAAACAUAGAAGAGCGG

SEQ ID NO: 52:
(una secuencia preparada por el acortamiento del clon mostrado por la SEQ
ID NO: 12 a una longitud de 26 nucleótidos)
CCGUUAUAUACCAGGGUAAACUAAACGG

5

10

15

20

SEQ ID NO: 53:
(una secuencia preparada por el acortamiento del clon mostrado por la SEQ ID NO: 13 a una longitud de 42 nucleótidos que incluye la secuencia común)
GGGUAACUAUGGUUAGAUAGAGUUAAAAACCAUAGAAGACCC
SEQ ID NO: 54:
(una secuencia preparada por el acortamiento del clon mostrado por la SEQ ID NO: 13 a una longitud de de 36 nucleótidos que incluye la secuencia común)
UAACUAUGGUUAGAUAGAGUUAAAAACCAUAGAAGA
SEQ ID NO: 55:
(una secuencia preparada por el acortamiento del clon mostrado por la SEQ ID NO: 13 a una longitud de 29 nucleótidos que incluye la secuencia común)
CUAUGGUUAGAUAGAGUUAAAAACCAUAG
SEQ ID NO: 56:
(una secuencia preparada por el acortamiento del clon mostrado por la SEQ ID NO: 13 a una longitud de 23 nucleótidos que incluye la secuencia común)
GGGUUAGAUAGAGUUAAAAACCC
SEQ ID NO: 57:
(una secuencia preparada por el acortamiento del clon mostrado por la SEQ ID NO: 14 a una longitud de 27 nucleótidos que incluye la secuencia común)
GCAUUUGAGAUAGAUUUAAACAAACGC

25

Todos los ácidos nucleicos de las SEQ ID NO: 49-57 se sintetizaron químicamente.

Se determinó si estos ácidos nucleicos se unen a la quimasa por el método

de resonancia del plasmón superficial. Las mediciones se tomaron usando Biacore T100 (fabricado por GE Healthcare) como se describe a continuación. Aproximadamente 4000 RU de quimasa (recombinante, fabricada por SIGMA) se inmovilizó en la superficie del chip sensor de un chip CM5, usando un kit acoplamiento de amina. 20 μ L de cada ácido nucleico, preparada a 0.3 μ M, como analito se inyectaron a una velocidad de flujo de 20 μ L/min. La solución C se usó como buffer de corrida. Los resultados de las mediciones se muestran en el cuadro 4. El método de evaluación usado fue el mismo que en el Ejemplo 1.

Como resultado, los ácidos nucleicos diferentes de la SEQ ID NO: 52 se identificaron como aptámeros que se unen a quimasa en forma significativamente más potente que el control 40N (Cuadro 4). Un sensorgrama que muestra cómo se unen los aptámeros mostrados por la SEQ ID NO: 13, 55, y 56 a la quimasa se san en la Fig. 7.

La actividad inhibidora de quimasa se determinó e la misma manera que en el Ejemplo 3. Los valores de IC_{50} respectivos se muestran en el cuadro 4.

Los ácidos nucleicos diferentes de la SEQ ID NO: 52 exhibieron actividad inhibidora potente (Cuadro 4). Los resultados para la SEQ ID NO: 51 y 52 demostraron que el aptámero mostrado por la SEQ ID NO: 12, que no comprende la secuencia común, retuvo su actividad después de acortarse a una longitud de 45 nucleótidos, y perdió la actividad cuando se acortó a una longitud de 26 nucleótidos.

Mientras tanto, los resultados para la SEQ ID NO: 56 mostraron que el aptámero mostrado por la SEQ ID NO: 13, que comprende la secuencia común, se podía acortar a una longitud de 23 nucleótidos. Esto demuestra que la secuencia común mostrada por la SEQ ID NO: 21 es crítica para la unión y la actividad inhibidora contra la quimasa.

Debido a que las SEQ ID NO: 49 y 57 también exhibieron actividad inhibidora, esto demostró que los N_1N_2 contenidos en la secuencia común no se limitan a GU, y que no hay limitación respecto de la secuencia contenida en la estructura del tallo

de la SEQ ID NO: 56 en la Fig. 6, siempre y cuando se mantenga la estructura del tallo.

Estos aptámeros se consideran útiles como inhibidores de quimasa.

CUADRO 4

5

10

SEQ ID NO	Número de ID de secuencia del clon original	Longitud	Actividad de unión determinada mediante Biacore	IC ₅₀ [μM]
49	4	29	++	0.117±0.066
50	4	35	++	0.138±0.093
51	12	45	++	0.024±0.009
52	12	26	+	>1
53	13	42	++	0.066±0.024
54	13	36	++	0.051±0.033
55	13	29	++	0.055±0.023
56	13	23	++	0.046±0.031
57	14	27	++	0.099±0.013

CUADRO 4

Actividad de unión y actividad inhibidora para quimasa (IC₅₀)

“++” representa una secuencia que se une a quimasa en forma significativamente más fuerte que el control negativo 40N. “+” representa una secuencia que se une a quimasa en forma equivalente en comparación con el control negativo 40N. Aquí, 40N representa la combinación de ácidos nucleicos usada en la 1ra ronda del Ejemplo 1, que comprende una secuencia aleatoria de 40 nucleótidos. “>1” indica que no se observó actividad inhibidora en el rango de concentración hasta 1 μM. Cada valor de IC₅₀ es un valor promedio para 2 a 3 mediciones.

El control negativo 40N no exhibió actividad inhibidora en las concentraciones de hasta 1 μM (IC₅₀>1 μM). El control positivo quimostatina exhibió valores de IC₅₀ de 0.1 μM-0.2 μM.

En síntesis, los ácidos nucleicos enumerados en el cuadro 4, diferentes de la SEQ ID NO: 52, exhibieron actividad inhibidora contra quimasa. Los ácidos nucleicos que exhibieron valores de IC₅₀ de 0.1 μM o menos, en particular, se pueden describir como portadores de un efecto inhibidor notable.

EJEMPLO 5

Efecto de la sustitución, supresión de base(s) del aptámero acortado

La mutación o supresión se introdujo en el aptámero mostrado por la SEQ ID NO: 56, y se examinó la influencia sobre la actividad de unión y la actividad inhibidora. Las secuencias se muestran en la SEQ ID NO: 58-68.

Las secuencias de nucleótidos de los aptámeros respectivos mostrados por las siguientes SEQ ID NO: 58-68 se muestran a continuación. A menos que se especifique de lo contrario, las secuencias respectivas mencionadas a continuación están en la dirección de 5' a 3', la modificación en la posición 2' de ribosa (por ejemplo, U(F) muestra modificación de la posición 2' de ribosa del uracilo con F) se muestra entre paréntesis, y F es un átomo de flúor.

15	SEQ ID NO: 58: (secuencia que contiene 13 bases de ácido nucleicos colocadas en forma aleatoria contenidas en la secuencia común del clon mostrada por la SEQ ID NO: 56) GGGU(F)U(F)GAAGAU(F)AU(F)U(F)AAAGAAC(F)C(F)C(F)
20	SEQ ID NO: 59: (secuencia en donde N₂ contenido en la secuencia común del clon mostrada por la SEQ ID NO: 56 está sustituido) GGGU(F)U(F)AGAU(F)AGAGAU(F)AAAAAC(F)C(F)C(F)

5

SEQ ID NO: 60:
(secuencia en donde N₂ contenido en la secuencia común del clon mostrada por la SEQ ID NO: 56 está sustituido)
GGGU(F)U(F)AGAU(F)AGAGC(F)U(F)AAAAAC(F)C(F)C(F)

10

SEQ ID NO: 61:
(secuencia en donde N₁ contenido en la secuencia común del clon mostrada por la SEQ ID NO: 56 está sustituido)
GGGU(F)U(F)AGAU(F)AGAU(F)U(F)U(F)AAAAAC(F)C(F)C(F)

15

SEQ ID NO: 62:
(secuencia en donde X₁ y X₂ contenidos en la secuencia común del clon mostrada por la SEQ ID NO: 56 están sustituidos)
GGGU(F)U(F)GGAU(F)AGAGU(F)U(F)AAGAAC(F)C(F)C(F)

20

SEQ ID NO: 63:
(secuencia en donde la secuencia base contenida en el clon mostrado por la SEQ ID NO: 56 excepto la secuencia común está sustituida)
GC(F)U(F)AC(F)AGAU(F)AGAGU(F)U(F)AAAGU(F)AGC(F)

SEQ ID NO: 64:
(secuencia en donde la secuencia base contenida en el clon mostrada por la SEQ ID NO: 56 excepto la secuencia común está sustituida)
GU(F)C(F)AC(F)AGAU(F)AGAGU(F)U(F)AAAGU(F)GAC(F)

5	SEQ ID NO: 65: (secuencia en donde la secuencia base contenida en el clon mostrada por la SEQ ID NO: 56 excepto la secuencia común está parcialmente sustituida y parcialmente suprimida) GGC(F)AGAU(F)AGAGU(F)U(F)AAAGC(F)C(F)
10	SEQ ID NO: 66: (secuencia en donde la base purínica contenida en las secuencia común del clon mostrada por la SEQ ID NO: 56 está sustituida con base pirimidínica) GGGU(F)U(F)AGAU(F)CGAGU(F)U(F)AAAAAC(F)C(F)C(F)
15	SEQ ID NO: 67: (secuencia en donde la base purínica contenida en las secuencia común del clon mostrada por la SEQ ID NO: 56 está sustituida con base pirimidínica) GGGU(F)U(F)AGAU(F)ACAGU(F)U(F)AAAAAC(F)C(F)C(F)
20	SEQ ID NO: 68: (secuencia en donde la base purínica contenida en las secuencia común del clon mostrada por la SEQ ID NO: 56 está sustituida con base pirimidínica) GGGU(F)U(F)AGAU(F)AGUGU(F)U(F)AAAAAC(F)C(F)C(F)

25 Todos los ácidos nucleicos de la SEQ ID NO: 58-68 se prepararon por síntesis química. Se evaluó si estos ácidos nucleicos se unen a quimasa por el método de resonancia del plasmón superficial de la misma manera que en el Ejemplo 4. La actividad inhibidora sobre quimasa se midió de la misma manera que en el Ejemplo 3. Los

resultados se muestran en Cuadro 5.

Como resultado, se halló que los ácidos nucleicos de la SEQ ID NO: 59-65 entre los que se muestran en el cuadro 5 retuvieron fuerza de unión potente y fuerte actividad inhibidora.

5 Debido a que la actividad de unión y la actividad inhibidora de la SEQ ID NO: 58 disminuyó a casi el mismo nivel que en 40N/30N usado en los Ejemplos 1 y 2, se demostró que la secuencia común mostrada por la SEQ ID NO: 21 es importante para la unión y las actividades inhibidoras sobre quimasa. A partir de estos resultados, la SEQ ID NO: 58 se usó como control negativo del aptámero acortado en los siguientes Ejemplos
10 (Ejemplos 5-9).

 A partir de los resultados de las SEQ ID NO: 59-61, se demostró que N_1 y N_2 contenidos en las secuencias comunes pueden ser cualquier nucleótido, con preferencia GU, GA, GC y UU. A partir de los resultados de la SEQ ID NO: 62, se demostró que X_1 y X_2 pueden ser cualquier nucleótido, y con preferencia son A y G, con
15 más preferencia ambos A o ambos G.

 A partir de los resultados de la SEQ ID NO: 63-65, se demostró que la secuencia de pares de bases (por ejemplo, SEQ ID NO: 56 de la Fig. 6) de la estructura del tallo contenida en ella excepto la secuencia común puede ser cualquier nucleótido siempre que se mantenga la estructura del tallo, y la longitud sea con preferencia de 3
20 pares de bases o mayor.

 A partir de los resultados de la SEQ ID NO: 66-68, se demostró nuevamente la importancia de la secuencia común, ya que la introducción de la mutación en la secuencia común reduce la actividad.

CUADRO 5

Actividad de unión a quimasa y actividad inhibidora de quimasa (IC₅₀).

SEQ ID NO:	Actividad de unión usando Biacore	IC ₅₀ [μM]
58	+	>1
59	++	0.038±0.009
60	++	0.026±0.006
61	++	0.023±0.006
62	++	0.029±0.004
63	++	0.023±0.003
64	++	0.020±0.005
65	++	0.056±0.046
66	+	>1
67	+	>1
68	+	>1

5

10

En la actividad de unión, “++” muestra significativa unión a quimasa respecto de la SEQ ID NO: 58 que es un control negativo, y “+” muestra similar nivel de unión que la SEQ ID NO: 58 que es un control negativo. En la actividad inhibidora, “>1” muestra sin actividad inhibidora en el rango de concentración hasta 1 μM. El valor de IC₅₀ es un valor promedio de dos mediciones.

15

La SEQ ID NO: 58 no mostró actividad inhibidora en el rango de concentración hasta 1 μM (IC₅₀>1 μM). Además, el valor de IC₅₀ de la quimostatina, que es un control positivo, fue 0.1 μM-0.2 μM. A partir de los resultados anteriores, es evidente que, entre los aptámeros mostrados en el cuadro 5, los aptámeros mostrados por la SEQ ID NO: 59-65 tienen una fuerte actividad inhibidora de quimasa (IC₅₀<0.1 μM).

20

EJEMPLO 6

Alteración del aptámero acortado – 1

Para aumentar la resistencia a la nucleasa del aptámero mostrado por la SEQ ID NO: 56, se prepararon un aptámero alterado con modificación terminal, un aptámero alterado en donde la posición 2’ de ribosa de la base purínica de la secuencia está modificada con un grupo O-metilo o F, y un aptámero alterado en donde se introduce

25

fosforotioato. Las secuencias se muestran en las SEQ ID NO: 56(1)-56(14), 56(17)-56(19). Además, se preparó un aptámero alterado en donde la modificación del nucleótido pirimidínico contenido en la secuencia común del aptámero mostrado por la SEQ ID NO: 56 (2'-F; modificación de la posición 2' de la ribosa con F) cambia a tipo nativa (2'-OH), y

5 se evaluó la necesidad de modificación. Las secuencias de estas se muestran en las SEQ ID NO: 56(15), 56(16).

Las respectivas secuencias de nucleótidos se muestran a continuación. A menos que se especifique de lo contrario, las secuencias respectivas mencionadas a continuación están en la dirección de 5' a 3', la modificación en la posición 2' de ribosa se

10 muestra entre paréntesis, F es un átomo de flúor y M es un grupo O-metilo. En las respectivas secuencias terminales, idT muestra modificación con dT invertido, y PEG muestra modificación con polietilenglicol ramificado de 40 kDa. En las secuencias, s muestra fosforotioación de un grupo fosfato entre los nucleótidos.

5	SEQ ID NO: 56(1): (secuencia en donde ambas terminales del clon mostrado por la SEQ ID NO: 56 están modificados con idT) idT-GGGU(F)U(F)AGAU(F)AGAGU(F)U(F)AAAAAC(F)C(F)C(F)-idT
10	SEQ ID NO: 56(2): (secuencia en donde la modificación se introduce en 3 posiciones de la secuencia diferentes de la secuencia común del clon mostrada por la SEQ ID NO: 56) G(M)G(M)G(M)U(F)U(F)AGAU(F)AGAGU(F)U(F)AAAAAC(F)C(F)C(F)
15	SEQ ID NO: 56(3): (secuencia en donde la modificación se introduce en 2 posiciones de la secuencia diferentes de la secuencia común del clon mostrada por la SEQ ID NO: 56) GGGU(F)U(F)AGAU(F)AGAGU(F)U(F)AAAA(M)A(M)C(F)C(F)C(F)
20	SEQ ID NO: 56(4): (secuencia en donde la modificación se introduce en la posición 1 de la secuencia común del clon mostrada por la SEQ ID NO: 56) GGGU(F)U(F)AGAU(F)A(M)GAGU(F)U(F)AAAAAC(F)C(F)C(F)

5

SEQ ID NO: 56(5): (secuencia en donde la modificación se introduce en 2 posiciones de la secuencia común del clon mostrada por la SEQ ID NO: 56) GGGU(F)U(F)AGAU(F)AGAGU(F)U(F)A(M)A(M)AAAC(F)C(F)C(F)
SEQ ID NO: 56(6): (secuencia en donde la modificación se introduce en la posición 1 de la secuencia común del clon mostrada por la SEQ ID NO: 56) GGGU(F)U(F)AG(M)AU(F)AGAGU(F)U(F)AAAAAC(F)C(F)C(F)
SEQ ID NO: 56(7): (secuencia en donde la modificación se introduce en la posición 1 de la secuencia común del clon mostrada por la SEQ ID NO: 56) GGGU(F)U(F)AGA(M)U(F)AGAGU(F)U(F)AAAAAC(F)C(F)C(F)
SEQ ID NO: 56(8): (secuencia en donde la modificación se introduce en la posición 1 de la secuencia común del clon mostrada por la SEQ ID NO: 56) GGGU(F)U(F)AGAU(F)AG(M)AGU(F)U(F)AAAAAC(F)C(F)C(F)
SEQ ID NO: 56(9): (secuencia en donde la modificación se introduce en la posición 1 de la secuencia común del clon mostrada por la SEQ ID NO: 56) GGGU(F)U(F)AGAU(F)AGA(M)GU(F)U(F)AAAAAC(F)C(F)C(F)

5

SEQ ID NO: 56(10):
(secuencia en donde la modificación se introduce en la posición 1 de la
secuencia común del clon mostrada por la SEQ ID NO: 56)
GGGU(F)U(F)A(M)GAU(F)AGAGU(F)U(F)AAAAAC(F)C(F)C(F)

10

SEQ ID NO: 56(11):
(secuencia en donde la modificación se introduce en la posición 1 de la
secuencia común del clon mostrada por la SEQ ID NO: 56)
GGGU(F)U(F)AGAU(F)AGAGU(F)U(F)AAA(M)AAC(F)C(F)C(F)

15

SEQ ID NO: 56(12):
(secuencia en donde la modificación se introduce en la posición 1 de la
secuencia común del clon mostrada por la SEQ ID NO: 56)
GGGU(F)U(F)AGAU(F)AGAG(M)U(F)U(F)AAAAAC(F)C(F)C(F)

20

SEQ ID NO: 56(13):
(secuencia en donde la modificación se introduce en la posición 1 de la
secuencia común del clon mostrada por la SEQ ID NO: 56)
GGGU(F)U(F)AGAU(F)AG(F)AGU(F)U(F)AAAAAC(F)C(F)C(F)

SEQ ID NO: 56(14):
(secuencia en donde la modificación se introduce en la posición 1 de la
secuencia común del clon mostrada por la SEQ ID NO: 56)
GGGU(F)U(F)AGAU(F)AGA(F)GU(F)U(F)AAAAAC(F)C(F)C(F)

5	SEQ ID NO: 56(15): (secuencia en donde el nucleótido 9no U(F) del clon mostrado por la SEQ ID NO: 56 está sustituido con U) GGGU(F)U(F)AGAUAGAGU(F)U(F)AAAAAC(F)C(F)C(F)
10	SEQ ID NO: 56(16): (secuencia en donde el nucleótido 15vo U(F) del clon mostrado por la SEQ ID NO: 56 está sustituido con U) GGGU(F)U(F)AGAU(F)AGAGU(F)UAAAAAC(F)C(F)C(F)
15	SEQ ID NO: 56(17): (secuencia en donde las partes terminales del clon mostradas por la SEQ ID NO: 56 están modificadas con PEG y idT) PEG-GGGU(F)U(F)AGAU(F)AGAGU(F)U(F)AAAAAC(F)C(F)C(F)-idT
20	SEQ ID NO: 56(18): (secuencia en donde un grupo fosfato de la secuencia común del clon mostrada por la SEQ ID NO: 56 está tratado con fosforotioato) GGGU(F)U(F)sAGAU(F)AGAGU(F)U(F)AAAAAC(F)C(F)C(F)
	SEQ ID NO: 56(19): (secuencia en donde un grupo fosfato de la secuencia común del clon mostrada por la SEQ ID NO: 56 está tratado con fosforotioato) GGGU(F)U(F)AsGAU(F)AGAGU(F)U(F)AAAAAC(F)C(F)C(F)

Todos los ácidos nucleicos de la SEQ ID NO: 56(1)-56(19) se prepararon por síntesis química. Se evaluó si estos ácidos nucleicos se unen a quimasa por el método de resonancia del plasmón superficial de la misma manera que en el Ejemplo 4. Los resultados de la medición se muestran en el cuadro 6.

5 Como resultado, los ácidos nucleicos diferentes de la SEQ ID NO: 56(8), 56(10), 56(13), 56(14) mostraron una actividad de unión a quimasa más significativa que la SEQ ID NO: 58, que es un control negativo.

10 La actividad inhibidora sobre la quimasa se midió de la misma manera que en el Ejemplo 3. Los valores de IC_{50} se muestran en el cuadro 6. Se halló que los ácidos nucleicos diferentes de la SEQ ID NO: 56(8), 56(10), 56(13), 56(14) mostró una actividad inhibidora, aunque el varíe el nivel de la actividad inhibidora. En comparación con los valores de IC_{50} , la actividad inhibidora de la SEQ ID NO: 56(1)-56(7), 56(11), 56(12) se mantuvo casi el mismo nivel que la SEQ ID NO: 56. A la inversa, la actividad inhibidora de la SEQ ID NO: 56(9), 56(15), 56(16), 56(17) disminuyó en comparación con la SEQ ID
15 NO: 56, y se demostró que la actividad inhibidora de la SEQ ID NO: 56(8), 56(10), 56(13), 56(14) ha desaparecido. Por otra parte, se demostró que la actividad inhibidora de la SEQ ID NO: 56(18), 56(19) ha aumentado respecto de la SEQ ID NO: 56.

20 A partir de los resultados de la SEQ ID NO: 56(1), 56(17), se halló que la influencia de la modificación de la terminal sobre la actividad era pequeña. A partir de los resultados de la SEQ ID NO: 56(2), 56(3), se demostró que la modificación de la secuencia del tallo no influyó la actividad. Como en los nucleótidos contenidos en las secuencia común, la modificación permitió el mantenimiento de la actividad inhibidora en 56(4)-56(7), 56(11), 56(12), y disminuyó (o eliminó) la actividad inhibidora de la SEQ ID NO: 56(8), 56(9), 56(10), 56(13), 56(14).

25 A partir de lo anterior, se halló que al menos un nucleótido del aptámero mostrado por la SEQ ID NO: 56 se puede modificar para aumentar la estabilidad del aptámero. Como modificación del nucleótido, por ejemplo, se pueden mencionar la

modificación 2'-amino y similares además de la modificación de 2'-O-metilo.

A la inversa, a partir de los resultados de la SEQ ID NO: 56(15), 56(16), se halló que la actividad inhibidora disminuye al cambiar alguno de los (9no o 15vo) aptámeros modificados por nucleótido (U(F)) contenido en las secuencia común del clon mostrada por la SEQ ID NO: 56 a ribonucleótidos nativos (U). En general, la modificación del nucleótido incrementa la resistencia a la nucleasa del aptámero. En consecuencia, al menos uno de los nucleótidos pirimidínicos (9na U y 15va U del clon mostrado por la SEQ ID NO: 56) contenido en las secuencia común con preferencia es un nucleótido modificado.

Más aún, a partir de los resultados de la SEQ ID NO: 56(8), 56(9), 56(10), 56(13), 56(14), al menos una de las 6ta A, 11va G y 12va A de las bases púricas nativas contenidas en las secuencia común del clon mostrada por la SEQ ID NO: 56 es con preferencia un ribonucleótido nativo, ya que la introducción de modificación en esta disminuye la actividad inhibidora.

Por otra parte, a partir de los resultados de la SEQ ID NO: 56(18), 56(19), se halló que la actividad inhibidora aumenta por la introducción del fosforotioato en al menos una posición como modificación de un grupo fosfato, además de la modificación de un residuo azúcar.

CUADRO 6

SEQ ID NO:	Actividad de unión usando Biacore	IC ₅₀ [μM]
56	++	0.027±0.002
56(1)	++	0.026±0.007
56(2)	++	0.024±0.003
56(3)	++	0.025±0.002
56(4)	++	0.027±0.005
56(5)	++	0.029±0.001
56(6)	++	0.031±0.001
56(7)	++	0.038±0.001
56(8)	+	>1
56(9)	++	0.111±0.003
56(10)	+	>1
56(11)	++	0.028±0.003
56(12)	++	0.035±0.003
56(13)	+	>1
56(14)	+	>1
56(15)	++	0.061±0.014
56(16)	++	0.058±0.002
56(17)	n.d.	0.058±0.000
56(18)	++	0.012±0.001
56(19)	++	0.008±0.001

CUADRO 6

Actividad de unión a quimasa y actividad inhibidora de quimasa (IC₅₀).

En la actividad de unión, “++” muestra unión más significativa a quimasa que la SEQ ID NO: 58 que es un control negativo, y “+” muestra similar nivel de unión que la SEQ ID NO: 58 que es un control negativo. “n.d.” muestra no determinado. “>1” no muestra actividad inhibidora en el rango de concentración hasta 1 μM. El valor de IC₅₀ es un valor promedio de dos mediciones.

La SEQ ID NO: 58, que es un control negativo, no mostró una actividad inhibidora en el rango de concentración hasta 1 μM (IC₅₀>1 μM). Además, el valor de IC₅₀ de la quimostatina, que es un control positivo, fue 0.1 μM-0.2 μM.

A partir de los resultados anteriores, entre los ácidos nucleicos que se muestran en el cuadro 6, en particular uno que muestra un valor de IC₅₀ de 0.1 μM o inferior tuvo una fuerte actividad inhibidora de quimasa y se sugirió que se puede usar

como inhibidor de quinasa.

EJEMPLO 7

Alteración del aptámero acortado – 2

5

El aptámero mostrado por la SEQ ID NO: 56 se alteró adicionalmente basado en los resultados del Ejemplo 6. Se sintetizaron aptámeros alterados sometidos a la introducción de grupo 2'-O-metilo, varias modificaciones terminales, introducción de fosforotioato, sustitución del ribonucleótido al ADN y similares, y una combinación de tales

10 modificaciones. Las secuencias se muestran en las SEQ ID NO: 56(20)-56(47), 61(1), 69, 69(1), 69(2), 70-74, 74(1), 75-77, 77(1), 77(2), 78-82.

Las respectivas secuencias de nucleótidos se muestran a continuación. A menos que se especifique lo contrario, las secuencias respectivas mencionadas a continuación están en la dirección de 5' a 3', las letras mayúsculas muestran ARN y las

15 letras minúsculas muestran ADN. La modificación de la posición 2' de ribosa se muestra entre paréntesis, F es un átomo de flúor y M es un grupo O-metilo. En las secuencias terminales respectivas, idT muestra la modificación con dT invertido, PEG muestra modificación con polietilenglicol ramificado de 40 kDa, Cho muestra modificación con colesterol y B muestra modificación con biotina. El péptido 1 muestra la conjugación de

20 Phe-Cys en la parte C-terminal, el péptido 2 muestra conjugación de Cys-Phe en la parte N-terminal y cada péptido se conjuga con el extremo 5' del ácido nucleico por medio de un enlace disulfuro. En las secuencias, s muestra fosforotioación de un grupo fosfato entre los nucleótidos.

5

10

15

20

25

SEQ ID NO: 56(20): G(M)G(M)G(M)U(F)U(F)AG(M)A(M)U(F)A(M)GAGU(F)U(F)A(M)A(M)AA(M) A(M)C(F)C(F)C(F)
SEQ ID NO: 56(21): G(M)G(M)G(M)U(F)U(F)AG(M)A(M)U(F)A(M)GAG(M)U(F)U(F)A(M)A(M)A(M))A(M)A(M)C(F)C(F)C(F)
SEQ ID NO: 56(22): G(M)G(M)G(M)U(F)U(F)sAG(M)A(M)U(F)A(M)GAG(M)U(F)U(F)A(M)A(M)A(M)A(M)A(M)C(F)C(F)C(F)
SEQ ID NO: 56(23): G(M)G(M)G(M)U(F)U(F)AsG(M)A(M)U(F)A(M)GAG(M)U(F)U(F)A(M)A(M)A(M)A(M)A(M)C(F)C(F)C(F)
SEQ ID NO: 56(24): idT- G(M)G(M)G(M)U(F)U(F)AGAU(F)AGAGU(F)U(F)AAAA(M)A(M)C(F)C(F)C(F))-idT
SEQ ID NO: 56(25): idT-GGGU(F)U(F)AG(M)A(M)U(F)A(M)GAGU(F)U(F)AAAAAC(F)C(F)C(F)- idT

5

SEQ ID NO: 56(26): idT- G(M)G(M)G(M)U(F)U(F)AG(M)A(M)U(F)A(M)GAG(M)U(F)U(F)A(M)A(M)A (M)A(M)A(M)C(F)C(F)C(F)-idT
SEQ ID NO: 56(27): PEG- G(M)G(M)G(M)U(F)U(F)AG(M)A(M)U(F)A(M)GAG(M)U(F)U(F)A(M)A(M)A (M)A(M)A(M)C(F)C(F)C(F)-idT
SEQ ID NO: 56(28): idT- G(M)G(M)G(M)U(F)U(F)AsG(M)A(M)U(F)A(M)GAG(M)U(F)U(F)A(M)A(M) A(M)A(M)A(M)C(F)C(F)C(F)-idT
SEQ ID NO: 56(29): idT- G(M)G(M)G(M)U(F)U(F)sAsG(M)A(M)U(F)A(M)GAG(M)U(F)U(F)A(M)A(M) A(M)A(M)A(M)C(F)C(F)C(F)-idT
SEQ ID NO: 56(30): idT- G(M)G(M)G(M)U(F)U(F)AGA(M)U(F)A(M)GAG(M)U(F)U(F)A(M)A(M)A(M) A(M)A(M)C(F)C(F)C(F)-idT

5

10

15

20

SEQ ID NO: 56(31): idT- G(M)G(M)G(M)U(F)U(F)AG(M)AU(F)A(M)GAG(M)U(F)U(F)A(M)A(M)A(M) A(M)A(M)C(F)C(F)C(F)-idT
SEQ ID NO: 56(32): idT- G(M)G(M)G(M)U(F)U(F)AGAU(F)A(M)GAG(M)U(F)U(F)A(M)A(M)A(M)A(M))A(M)C(F)C(F)C(F)-idT
SEQ ID NO: 56(33): idT- G(M)G(M)G(M)U(F)U(F)AsGA(M)U(F)A(M)GAG(M)U(F)U(F)A(M)A(M)A(M))A(M)A(M)C(F)C(F)C(F)-idT
SEQ ID NO: 56(34): idT- G(M)G(M)G(M)U(F)U(F)AsG(M)AU(F)A(M)GAG(M)U(F)U(F)A(M)A(M)A(M))A(M)A(M)C(F)C(F)C(F)-idT
SEQ ID NO: 56(35): idT- G(M)G(M)G(M)U(F)U(F)AsGAU(F)A(M)GAG(M)U(F)U(F)A(M)A(M)A(M)A (M)A(M)C(F)C(F)C(F)-idT

5	SEQ ID NO: 56(36): idT- G(M)G(M)G(M)U(F)U(F)AGsAU(F)A(M)GAG(M)U(F)U(F)A(M)A(M)A(M)A(M) A(M)C(F)C(F)C(F)-idT
10	SEQ ID NO: 56(37): idT- G(M)G(M)G(M)U(F)U(F)AsGsAU(F)A(M)GAG(M)U(F)U(F)A(M)A(M)A(M)A(M) A(M)C(F)C(F)C(F)-idT
15	SEQ ID NO: 56(38): idT- G(M)G(M)G(M)U(F)U(F)sAsGAU(F)A(M)GAG(M)U(F)U(F)A(M)A(M)A(M)A(M) A(M)C(F)C(F)C(F)-idT
20	SEQ ID NO: 56(39): PEG- GG(M)G(M)U(F)U(F)AG(M)A(M)U(F)A(M)GAG(M)U(F)U(F)A(M)A(M)A(M)A(M) A(M)C(F)C(F)C(F)-idT
20	SEQ ID NO: 56(40): idT- GG(M)G(M)U(F)U(F)AG(M)A(M)U(F)A(M)GAG(M)U(F)U(F)A(M)A(M)A(M)A(M) A(M)C(F)C(F)C(F)-idT

5

SEQ ID NO: 56(41):
idT-
GG(M)G(M)U(F)U(F)AsG(M)A(M)U(F)A(M)GAG(M)U(F)U(F)A(M)A(M)A(M)
)A(M)A(M)C(F)C(F)C(F)-idT

10

SEQ ID NO: 56(42):
Cho-
G(M)G(M)G(M)U(F)U(F)AG(M)A(M)U(F)A(M)GAG(M)U(F)U(F)A(M)A(M)A(
M)A(M)A(M)C(F)C(F)C(F)-idT

15

SEQ ID NO: 56(43):
1-
G(M)G(M)G(M)U(F)U(F)AG(M)A(M)U(F)A(M)GAG(M)U(F)U(F)A(M)A(M)A(
M)A(M)A(M)C(F)C(F)C(F)-idT

20

SEQ ID NO: 56(44):
2-
G(M)G(M)G(M)U(F)U(F)AG(M)A(M)U(F)A(M)GAG(M)U(F)U(F)A(M)A(M)A(
M)A(M)A(M)C(F)C(F)C(F)-idT

25

SEQ ID NO: 56(45):
idT-
G(M)G(M)G(M)U(F)U(F)AG(M)A(M)U(F)A(M)GAG(M)U(F)U(F)A(M)A(M)A(
M)A(M)A(M)C(F)C(F)C(F)-PEG

5

SEQ ID NO: 56(46):
B-idT-
G(M)G(M)G(M)U(F)U(F)AG(M)A(M)U(F)A(M)GAG(M)U(F)U(F)A(M)A(M)A(M)
)A(M)A(M)C(F)C(F)C(F)-idT

10

SEQ ID NO: 56(47):
idT-
G(M)G(M)G(M)U(F)U(F)AG(M)A(M)U(F)A(M)GAG(M)U(F)U(F)A(M)A(M)A(M)
)A(M)A(M)C(F)C(F)C(F)-idT-B

15

SEQ ID NO: 56(48):
idT-
G(M)G(M)G(M)U(F)U(F)AG(M)A(M)U(F)A(M)GAG(M)U(F)U(F)A(M)A(M)A(M)
)A(M)A(M)ccc-idT

SEQ ID NO: 56(49):
idT-
G(M)G(M)G(M)U(F)U(F)aG(M)AU(F)A(M)GAG(M)U(F)U(F)A(M)A(M)A(M)A(
M)A(M)C(F)C(F)C(F)-idT

SEQ ID NO: 56(50):
idT-
G(M)G(M)G(M)U(F)U(F)AG(M)aU(F)A(M)GAG(M)U(F)U(F)A(M)A(M)A(M)A(
M)A(M)C(F)C(F)C(F)-idT

5

10

15

20

SEQ ID NO: 56(51): B-idT- G(M)G(M)G(M)U(F)U(F)AG(M)aU(F)A(M)GAG(M)U(F)U(F)A(M)A(M)A(M)A(M))A(M)C(F)C(F)C(F)-idT
SEQ ID NO: 56(52): idT- G(M)G(M)G(M)U(F)U(F)AgaU(F)A(M)GAG(M)U(F)U(F)A(M)A(M)A(M)A(M)A(M)C(F)C(F)C(F)-idT
SEQ ID NO: 61(1): G(M)G(M)G(M)U(F)U(F)AG(M)A(M)U(F)A(M)GAU(F)U(F)U(F)A(M)A(M)A(M)A (M)A(M)C(F)C(F)C(F)
SEQ ID NO: 69: PEG- A(M)A(M)A(M)G(M)G(M)G(M)U(F)U(F)AG(M)A(M)U(F)A(M)GAG(M)U(F)U(F) A(M)A(M)A(M)A(M)A(M)C(F)C(F)C(F)-idT
SEQ ID NO: 69(1): idT- A(M)A(M)A(M)G(M)G(M)G(M)U(F)U(F)AsG(M)A(M)U(F)A(M)GAG(M)U(F)U(F))A(M)A(M)A(M)A(M)A(M)C(F)C(F)C(F)-idT
SEQ ID NO: 69(2): idT- A(M)A(M)A(M)G(M)G(M)G(M)U(F)U(F)AG(M)A(M)U(F)A(M)GAG(M)U(F)U(F) A(M)A(M)A(M)A(M)A(M)C(F)C(F)C(F)-idT

5

10

15

20

SEQ ID NO: 70: idT- G(M)G(M)G(M)ttAG(M)A(M)U(F)A(M)GAG(M)U(F)U(F)A(M)A(M)A(M)A(M)A(M) C(F)C(F)C(F)-idT
SEQ ID NO: 71: idT- G(M)G(M)G(M)U(F)U(F)AG(M)A(M)U(F)A(M)GAG(M)tU(F)A(M)A(M)A(M)A(M)A (M)C(F)C(F)C(F)-idT
SEQ ID NO: 72: idT- G(M)G(M)G(M)ttAG(M)A(M)U(F)A(M)GAG(M)tU(F)A(M)A(M)A(M)A(M)A(M)ccc- idT
SEQ ID NO: 72(1): idT-G(M)G(M)G(M)ttAG(M)aU(F)A(M)GAG(M)tU(F)A(M)A(M)A(M)A(M)A(M)ccc- idT
SEQ ID NO: 72(2): idT- G(M)G(M)G(M)ttAsG(M)aU(F)A(M)GAG(M)tU(F)A(M)A(M)A(M)A(M)A(M)ccc- idT
SEQ ID NO: 72(3): idT-G(M)G(M)G(M)ttAG(M)A(M)U(F)A(M)GAgtU(F)A(M)A(M)A(M)A(M)A(M)ccc- idT

5	SEQ ID NO: 72(4): idT- G(M)G(M)G(M)ttAG(M)A(M)U(F)A(M)GAG(M)tU(F)aA(M)A(M)A(M)A(M)cc c-idT
10	SEQ ID NO: 72(5): idT- G(M)G(M)G(M)ttAG(M)A(M)U(F)A(M)GAG(M)tU(F)A(M)aA(M)A(M)A(M)cc c-idT
15	SEQ ID NO: 72(6): idT- G(M)G(M)G(M)ttAG(M)A(M)U(F)A(M)GAG(M)tU(F)A(M)A(M)aA(M)A(M)cc c-idT
20	SEQ ID NO: 72(7): idT- G(M)G(M)G(M)ttAG(M)aU(F)A(M)GAG(M)tU(F)A(M)A(M)A(M)A(M)A(M)cc c-PEG
	SEQ ID NO: 72(8): B-idT- G(M)G(M)G(M)ttAG(M)aU(F)A(M)GAG(M)tU(F)A(M)A(M)A(M)A(M)A(M)cc c-idT

Todos los ácidos nucleicos de la SEQ ID NO: 56(20)-56(52), 61(1), 69,
25 69(1), 69(2), 70-72, 72(1)-72(8) se prepararon por síntesis química. Se evaluó si estos
ácidos nucleicos se unen a la quimasa por el método de resonancia del plasmón
superficial de la misma manera que en el Ejemplo 4. Los resultados se muestran en

Cuadro 7.

Como resultado, todos los ácidos nucleicos (que excluyen los ácidos nucleicos no determinados) se unieron más significativamente a la quimasa que el control negativo.

5 La actividad inhibidora de quimasa se midió de la misma manera que en el Ejemplo 3. Los valores de IC_{50} se muestran en el cuadro 7. Como resultado, todos los ácidos nucleicos mostrados del cuadro 7 exhibieron una fuerte actividad inhibidora.

A partir de los resultados de la SEQ ID NO: 56(27) y 56(45), se demostró que una modificación terminal tal como PEG se puede introducir en cualquiera de los
10 extremos 5' y el extremo 3'.

A partir de los resultados de la SEQ ID NO: 56(43), 56(44), 56(46) y 56(47), más aún, se halló que la modificación terminal puede ser un péptido, aminoácido o un compuesto tal como biotina y similares, además de idT y PEG mostrados en el Ejemplo 6.

A partir de los resultados de la SEQ ID NO: 56(26) y 69(2), 56(27) y 69, y
15 56(28) y 69(1), más aún, se halló que la modificación terminal tal como idT y PEG por medio de una cadena del polinucleótido no influye la actividad inhibidora. Como tal espaciador, se puede usar cualquier cadena de polinucleótido y, por ejemplo, un espaciador tipo alquilo.

También se halló que la actividad inhibidora aumenta al sustituir una parte
20 de la forma F a una forma de ADN.

CUADRO 7

SEQ NO:	ID	Actividad de unión usando Biacore	IC ₅₀ [μM]	SEQ NO:	ID	Actividad de unión usando Biacore	IC ₅₀ [μM]
56(20)	++		0.102±0.009	56(44)	++		0.042±0.007
56(21)	++		0.045±0.006	56(45)	n.d.		0.059±0.006
56(22)	++		0.052±0.002	56(46)	++		0.049±0.002
56(23)	++		0.032±0.003	56(47)	++		0.037±0.006
56(24)	++		0.038±0.003	56(48)	++		0.036±0.003
56(25)	++		0.070±0.009	56(49)	++		0.069±0.000
56(26)	++		0.054±0.002	56(50)	++		0.027±0.002
56(27)	n.d.		0.084±0.006	56(51)	++		0.029±0.003
56(28)	++		0.044±0.002	56(52)	++		0.052±0.001
56(29)	++		0.036±0.003	61(1)	++		0.078±0.004
56(30)	++		0.034±0.003	69	n.d.		0.091±0.019
56(31)	++		0.023±0.001	69(1)	++		0.044±0.002
56(32)	++		0.017±0.000	69(2)	++		0.048±0.002
56(33)	++		0.035±0.002	70	++		0.027±0.004
56(34)	++		0.031±0.006	71	++		0.028±0.005
56(35)	++		0.024±0.005	72	++		0.020±0.002
56(36)	++		0.097±0.017	72(1)	++		0.013±0.003
56(37)	++		0.046±0.007	72(2)	++		0.014±0.002
56(38)	++		0.019±0.005	72(3)	++		0.050±0.004
56(39)	n.d.		0.086±0.018	72(4)	++		0.065±0.002
56(40)	++		0.051±0.001	72(5)	++		0.027±0.002
56(41)	++		0.053±0.013	72(6)	++		0.041±0.002
56(42)	++		0.071±0.001	72(7)	n.d.		0.055±0.002
56(43)	++		0.035±0.003	72(8)	n.d.		0.018±0.001

CUADRO 7

Actividad de unión a quimasa y actividad inhibidora de quimasa (IC₅₀).

En la actividad de unión, “++” muestra unión a quimasa más significativa que la SEQ ID NO: 58 que es un control negativo. “n.d.” muestra no determinado. El valor de IC₅₀ es un valor promedio de dos mediciones.

La SEQ ID NO: 58, que es un control negativo, no mostró una actividad inhibidora en el rango de concentración hasta 1 μM (IC₅₀>1 μM). Además, el valor de IC₅₀ de la quimostatina, que es un control positivo, fue 0.1 μM-0.2 μM.

A partir de los resultados anteriores, todos los ácidos nucleicos mostrados en el cuadro 7 tuvieron una fuerte actividad inhibidora de quimasa y se sugiere que se son utilizables como inhibidor de quinasa.

Sintetizando los resultados de los Ejemplos 1 a 7 anterior, un aptámero

efectivo como un inhibidor de quinasa satisface particularmente al menos una de las siguientes condiciones.

(1) Contiene la secuencia común (X_1 GAUAGAN₁N₂UAAX₂) mostrada por la SEQ ID NO: 21.

5 (2) Si bien el nucleótido pirimidínico contenido en la secuencia común puede ser un nucleótido nativo, una parte del nucleótido pirimidínico con preferencia es un nucleótido o ADN modificado.

(3) Si bien N₁N₂ puede ser cualquier nucleótido, con preferencia es GU, GA, GC, UU, CU o GT.

10 (4) Si bien X₁ y X₂ puede ser cualquier nucleótido, con preferencia estos son, sea idéntico o no, A o G, con más preferencia son ambos A o ambos G.

(5) Si bien los pares de bases de la secuencia de la estructura del tallo (por ejemplo, SEQ ID NO: 56 de la Fig. 6) puede ser cualquier nucleótido siempre que se mantenga la estructura del tallo, con preferencia su longitud es de 3 pares de bases o
15 más largos.

(6) Excepto para una parte de nucleótidos (6ta A, 11va G y 12va A de la SEQ ID NO: 56), cada nucleótido está parcialmente modificada o parcialmente sustituido con ADN.

(7) Se introduce una modificación terminal.

20 (8) Una parte de un grupo de fosfato entre los nucleótidos se pueden tratar con fosforotioato.

EJEMPLO 8

Medición de actividad inhibidora de quimasa usando angiotensina I como sustrato

25

Para la evaluación posterior de la actividad inhibidora del ácido nucleico de la presente invención, la actividad enzimática de quimasa se midió usando angiotensina I,

que es una sustancia nativa para quimasa, de acuerdo con el siguiente método. La angiotensina I se convierte por la quimasa a angiotensina II, durante el cual se libera un fragmento peptídico His-Leu. Debido a que el péptido His-Leu se deriva de modo fluorescente con o-ftalaldehído, se puede medir cuantitativamente su intensidad de fluorescencia.

El volumen total de la solución para una reacción enzimática del ensayo se ajustó a 50 μL , y la reacción se realizó en buffer de solución C. Primero, 0.3-0.75 ng de quimasa (recombinante, (fabricado por SIGMA) o nativa (fabricado por Calbiochem)) se diluyó con solución C para dar 5 μL de este. En la presente, la quimasa recombinante está expresada por levaduras, y la nativa es quimasa purificada de los mastocitos de piel humana. El ácido nucleico se diluyó en forma seriada con la solución C a una concentración de 0.0027-2 μM para dar 25 μL de este. La solución de quimasa (5 μL) y el ácido nucleico solución (25 μL) se mezclaron, y la mezcla se incubó a 37°C durante 5 min. A la inversa, se preparó angiotensina I 125 mM (fabricado por PEPTIDE INSTITUTE, INC.) en la solución C para dar 20 μL de este, que se incubó a 37°C durante 5 min. La solución de angiotensina I solución se añadió a una mezcla de quimasa y ácido nucleico para comenzar una reacción enzimática. La concentración de quimasa final de la solución de reacción fue 0.2-0.5 nM, y la concentración de sustrato final fue 50 μM . Después de la reacción a 37°C durante 90 min, se añadió solución de ácido tricloroacético 30% enfriado con hielo (25 μL) para inactivar la reacción. La mezcla completa se centrifugó a 4°C, 14000 rpm durante 10 min, y el sobrenadante (30 μL) se usó para la próxima reacción de inducción de la fluorescencia.

El sobrenadante (30 μL) mencionado anteriormente se añadió a una placa de 96 pocillos (negra, fabricado por Costar), una solución (15 μL) de 2% o-ftalaldehído (fabricado por SIGMA) en metanol y una solución de NaOH 0.3 M (170 μL) se añadieron a cada pocillo, y la mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 10 min. Luego, se

añadió solución de HCl 3 M (25 µL) para inactivar la reacción. La placa se ajustó a un lector de microplaca SpectraMax190 (fabricado por Molecular Device) y la intensidad de fluorescencia se midió a una longitud de excitación de 355 nm y una longitud de fluorescencia de 460 nm.

- 5 Usando la SEQ ID NO: 58 como control (control negativo) y quimostatina, que es un inhibidor de serina proteasa tipo quimotripsina conocido (control positivo), se llevaron a cabo un tratamiento y medición similar. La intensidad de fluorescencia en tiempo de reacción 0 min en cada condición se usó como blanco. La intensidad de fluorescencia detectada por la adición de la misma cantidad de solución C en vez del
- 10 ácido nucleico en la reacción enzimática de la quimasa se tomó como 100%, y la tasa inhibitoria de cada sustancia de ensayo se calculó por la siguiente fórmula.

$$\text{Tasa inhibidora (\%)} = [1 - \{(\text{intensidad de fluorescencia con la sustancia de ensayo} - \text{intensidad de fluorescencia del blanco con la sustancia de ensayo}) / (\text{intensidad de fluorescencia sin sustancia de ensayo} - \text{intensidad de fluorescencia del blanco sin sustancia de ensayo})\}] \times 100$$

15

Se determinó la concentración del inhibidor necesaria para el 50% de inhibición de la actividad enzimática (IC₅₀). Los resultados se muestran en Cuadro 8.

CUADRO 8

SEQ ID NO:	IC ₅₀ [μM] para quimasa nativa	IC ₅₀ [μM] para quimasa recombinante	SEQ ID NO:	IC ₅₀ [μM] para quimasa nativa	IC ₅₀ [μM] para quimasa recombinante
4	0.031	0.003	56(34)	0.162	0.057
13	0.074	0.041	56(35)	0.120	0.039
14	0.063	0.022	56(42)	0.601	0.687
53	0.764	0.446	56(43)	0.591	0.328
54	0.614	0.397	56(44)	0.643	0.414
55	0.606	0.354	56(45)	0.303	0.377
56	0.508	0.235	56(46)	0.742	0.426
65	0.878	0.274	56(47)	0.542	0.419
56(1)	0.404	0.207	56(48)	0.621	0.394
56(17)	0.613	0.456	56(50)	0.325	0.153
56(18)	0.174	0.108	56(51)	0.429	0.310
56(19)	0.130	0.055	69	>1	0.628
56(21)	0.722	0.361	69(1)	0.480	0.125
56(22)	0.563	0.237	69(2)	0.752	0.289
56(23)	0.360	0.119	70	0.478	0.239
56(26)	0.743	0.326	71	0.341	0.161
56(27)	>1	0.724	72	0.120	0.065
56(28)	0.410	0.137	72(1)	0.103	0.036
56(29)	0.366	0.080	72(2)	0.076	0.037
56(30)	0.521	0.210	72(5)	0.377	0.201
56(31)	0.266	0.089	72(6)	0.573	0.370
56(32)	0.185	0.078	72(7)	0.312	0.158
56(33)	0.291	0.085	72(8)	0.097	0.043

CUADRO 8

Actividad inhibidora de quimasa (IC₅₀) usando angiotensina I como sustrato.

IC₅₀ es el valor de una medición.

La SEQ ID NO: 58 usada como control negativo no mostró actividad inhibidora (IC₅₀>1 μM). Los valores de IC₅₀ de quimostatina, un control positivo, fueron 0.35-0.5 μM (Nativa), 0.45-0.6 μM (Recombinante). La actividad del aptámero conjugado con PEG es relativamente baja en comparación con el aptámero no unido con PEG. Este es un fenómeno general causado por el mayor tamaño de PEG (peso molecular aproximadamente 40.000) que el aptámero (peso molecular aproximadamente 10.000). Debido a que la conjugación con PEG aumenta marcadamente a farmacocinética in vivo, se espera un efecto in vivo aun si la eficacia disminuye algo in vitro.

A partir de los resultados anteriores, se espera que cualquier ácido nucleico

contenido en el cuadro 8 sea un fármaco para la profilaxis y/o tratamiento de varias enfermedades que involucran angiotensina, debido a que muestra una fuerte actividad inhibidora de quimasa aun cuando se usa angiotensina I, una sustancia nativa.

5

EJEMPLO 9**Medición de la actividad inhibidora de degradación de LTBP-1 usando fibroblasto de pulmón humano normal (fibroblasto de pulmón humano normal: NHLF)**

La quimasa está profundamente involucrada en la activación del TGF- β ,
10 que es uno de los factores importantes que causa fibrosis. Se sugiere que, en el proceso de la activación de TGF- β , la quimasa degrada LTBP-1 para liberar TGF- β latente, que está presente como forma latente en una matriz extracelular y está involucrado en la reacción de conversión de TGF- β latente al TGF- β activo. Se evaluó si el ácido nucleico de la presente invención tiene una actividad inhibidora contra la degradación de LTBP-1
15 por quimasa por el siguiente método.

Las células de NHLF criopreservados (fabricado por Cambrex Bio Science) se descongelaron rápidamente en un baño de agua a 37°C y se suspendieron en un medio (10% de FBS/F-12). Después de la centrifugación (1200 rpm, 5 min), el sobrenadante se extrajo y las células se resuspendieron en el medio. El medio se añadió
20 a una cantidad total de 10 mL, y la mezcla se transfirió a una placa de petri para cultivo celular y las células se cultivaron a 37°C, 5% de CO₂. La forma celular y el estado de cultivo se observaron con un microscopio y, después de la confluencia, el medio se intercambió con un medio libre de suero (0.2% de BSA/F-12). Dos días después del intercambio del medio, el sobrenadante del cultivo se recolectó, dispensó y se
25 criopreservó a -30°C.

El sobrenadante del cultivo NHLF (40 μ L) que se descongela cuando se

usa, se dispensó en un tubo, se añadió una solución de ácido nucleico obtenido por la dilución con la solución C a 50 μ M en 5 μ L. Como control positivo, la quimostatina se diluyó con la solución C y se añadió de la misma manera. Como control negativo, solo se usó la solución C y se añadió de la misma manera. Luego, la quimasa diluida con la solución E (solución C+0.1% BSA, 0.05% de azida sódica) a 100 ng/mL se añadió en 5 μ L. La concentración de quimasa final en la solución de reacción fue 10 ng/mL (0.33 nM), y la concentración del ácido nucleico final fue 5 μ M. Como control, se preparó un tubo libre de quimasa. Después de pipetear, las muestras se incubaron a 37°C durante 1 hora, y se mezclaron con una cantidad equivalente de buffer de lisis de electroforesis para 10 terminar la reacción. Luego, se detectó LTBP-1 en la muestra por transferencia Western que se muestra a continuación.

Una muestra obtenida por la mezcla con un buffer de lisis se hirvió durante 3 min, 10 μ L de la muestra se sometieron a electroforesis por la aplicación de la muestra a 5-20% de gel de acrilamida. Después de completar la migración, la mezcla se transfirió a un filtro de nitrocelulosa, y el filtro se bloqueó con 5% de leche descremada, 50 mM de 15 Tris-HCl (pH 8.0) y 0.05% de azida sódica. El filtro se hizo reaccionar con un anticuerpo anti-LTBP-1 monoclonal diluido con 2% de BSA, PBS y 0.05% de azida sódica a 2 μ g/mL a temperatura ambiente durante toda la noche. El filtro se lavó 3 veces, y se incubó con una solución de anticuerpo secundario (anticuerpo IgG anti-ratón marcado con HRP 20 diluido 10000 veces con 0.1% de BSA/PBS) a temperatura ambiente durante 2 horas. El filtro se lavó 5 veces, y se detectó con un sustrato luminiscente químico.

La presencia o ausencia de una actividad inhibidora de cada sustancia de ensayo se determinó sobre la base de la densidad y la posición de la banda de LTBP-1 (peso molecular). El análisis se demostró en tres experimentos independientes. La banda 25 de un pocillo sin adición de quimasa se tomó como control positivo (+), la banda del pocillo del control negativo se tomó como negativo (-), y presencia o ausencia de una actividad inhibidora de cada sustancia de ensayo se determinó visualmente a partir de la

banda del pocillo de cada sustancia de ensayo. Los resultados del análisis por transferencia Western se muestran en la Fig. 8, y los resultados de la determinación de la actividad inhibidora se muestran en el cuadro 9.

5

CUADRO 9

10

15

SEQ ID NO:	Calle No. de la Fig. 8	Actividad inhibidora
56	4, 10, 16, 24	+
56(1)	2	+
56(17)	12	+
56(19)	14	+
56(23)	15	+
56(26)	13, 25	+
56(27)	11	+
56(28)	17	+
56(29)	19	+
58	3, 27	-
69(1)	18	+
72(1)	26	+
Otros	Calle No. de la Fig. 8	actividad inhibidora
marcador	1, 8, 9, 23, 31	
Quimostatina	5, 20, 28	+
control negativo	6, 21, 29	-
control (sin adición de quimasa)	7, 22, 30	+

CUADRO 9

La presencia o ausencia de la actividad inhibidora sobre la degradación de LTBP-1.

5 "+" muestra la detección de una banda con el mismo nivel de densidad como banda de LTBP-1 en el control, y "-" muestra ausencia de la detección de la banda de LTBP-1 tan clara como la del control negativo.

10 La SEQ ID NO: 58 no mostró actividad inhibidora (-). La quimostatina, un control positivo, mostró una actividad inhibidora (+). Todos los aptámeros diferentes de la SEQ ID NO: 58, que están contenidos en el cuadro 9, mostraron una actividad inhibidora contra la degradación de LTBP-1.

15 A partir de los resultados anteriores, se halló que el aptámero de la presente invención inhibe la degradación de LTBP-1 por la quimasa. En consecuencia, se demostró que el aptámero se puede usar para la profilaxis y/o el tratamiento de varias enfermedades que involucran la activación del TGF- β , tales como fibrosis.

15

Aplicabilidad industrial

20 El aptámero y el complejo de la presente invención pueden ser útiles como agentes farmacéuticos, agentes de diagnóstico o reactivos para las enfermedades tales como enfermedades cardiovasculares, fibrosis y similares. El aptámero y el complejo de la presente invención también pueden ser útiles para la purificación y la concentración de la quimasa, así como la detección y cuantificación de la quimasa.

 Esta solicitud se basa en la solicitud de la patente japonesa No. 2009-140585, y cuyo contenido se incorpora en la presente como referencia.

NOVEDAD DE LA INVENCION**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un aptámero que se une a quimasa para inhibir la actividad de quimasa.
2. El aptámero de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado además porque comprende una secuencia de nucleótidos representada por $X_1\text{GAUAGAN}_1\text{N}_2\text{UAAX}_2$ (SEQ ID NO: 21; cada uno de X_1 y X_2 , sea idéntico o no, es A o G, y cada uno de N_1 y N_2 , sea idéntico o no, es A, G, C, U o T).
- 10 3. El aptámero de conformidad con la reivindicación 2, caracterizado además porque N_1N_2 es GA, GU, GC, UU, GT o CU.
4. El aptámero de conformidad con la reivindicación 2, caracterizado además porque X_1 y X_2 son ambos A o ambos G.
5. El aptámero de conformidad con la reivindicación 3 ó 4, caracterizado
- 15 además porque al menos uno de los nucleótidos pirimidínicos ha sido modificado o alterado.
6. El aptámero de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado además porque comprende cualquiera de las secuencias de nucleótidos (a), (b) y (c) siguientes: (a) un aptámero que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada
- 20 entre SEQ ID NO: 4-34, 38-57, 59-65 y 69-72 (con la condición de que el uracilo puede ser timina); (b) un aptámero que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada entre SEQ ID NO: 4-34, 38-57, 59-65 y 69-72 (con la condición de que el uracilo puede ser timina), en donde 1 a 5 nucleótidos están sustituidos, suprimidos, insertado o
- adicionados; y (c) una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de 70% o más a
- 25 una secuencia de nucleótidos seleccionada entre SEQ ID NO: 4-34, 38-57, 59-65 y 69-72 (con la condición de que el uracilo puede ser timina).

7. El aptámero de conformidad con la reivindicación 6, caracterizado además porque al menos uno de los nucleótidos contenidos en el aptámero ha sido modificado o alterado.

8. El aptámero de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado además porque comprende cualquiera de las secuencias de nucleótidos (a'), (b') y (c') siguientes: (a') una secuencia de nucleótidos seleccionada entre SEQ ID NO: 56(1)-56(7), 56(9), 56(11), 56(12), 56(15)-56(52), 61(1), 69(1), 69(2), y 72(1)-72(8) (con la condición de que el uracilo puede ser timina); (b') una secuencia de nucleótidos seleccionada entre SEQ ID NO: 56(1)-56(7), 56(9), 56(11), 56(12), 56(15)-56(52), 61(1), 69(1), 69(2), y 72(1)-72(8) (con la condición de que el uracilo puede ser timina), en donde 1 a 5 nucleótidos están sustituidos, suprimidos, insertado o adicionados; y (c') una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de 70% o más a una secuencia de nucleótidos seleccionada entre SEQ ID NO: 56(1)-56(7), 56(9), 56(11), 56(12), 56(15)-56(52), 61(1), 69(1), 69(2), y 72(1)-72(8) (con la condición de que el uracilo puede ser timina).

9. El aptámero de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado además porque cada uno de los grupo hidroxilo de las posiciones 2' de los nucleótidos pirimidínicos respectivos contenidos en el aptámero, sea idéntico o no, se pueden sustituir con un átomo o un grupo seleccionado del grupo que consiste en un átomo de hidrógeno, un átomo de flúor y un grupo metoxi.

10. El aptámero de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado además porque cada uno de los grupos hidroxilo en las posiciones 2' de los respectivos nucleótidos purínicos contenidos en el aptámero, sea idéntico o no, se puede sustituir con un átomo o grupo seleccionado del grupo que consiste en a átomo de hidrógeno, un átomo de flúor y un grupo metoxi.

11. Un complejo que comprende el aptámero de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 y una sustancia funcional.

12. El complejo de conformidad con la reivindicación 11, caracterizado además porque la sustancia funcional es una sustancia de afinidad, una sustancia para marcación, una enzima, un vehículo de administración de fármaco o un fármaco.

5 13. Un agente farmacéutico que comprende el aptámero de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 o el complejo de la reivindicación 11 ó 12.

14. El agente farmacéutico de conformidad con la reivindicación 13, caracterizado además porque se usa para prevenir o tratar una enfermedad cardiovascular o fibrosis.

10 15. Un reactivo de diagnóstico que comprende el aptámero de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 o el complejo de la reivindicación 11 ó 12.

16. Una sonda de detección de quimasa que comprende el aptámero de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 o el complejo de la reivindicación 11 ó 12.

15 17. Un portador de fase sólida para purificación de quimasa que comprende el aptámero de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 o el complejo de la reivindicación 11 ó 12.

18. Un método de detectar quimasa, que comprende usar el aptámero de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 o el complejo de la reivindicación 11 ó 12.

19. Un método de purificar quimasa, que comprende usar el aptámero de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 o el complejo de la reivindicación 11 ó 12.

RESUMEN DE LA INVENCION

Se proporcionan un aptámero unido a quimasa para inhibir la actividad de quimasa; un aptámero que contiene una secuencia de nucleótidos representada por

5 $X_1GAUAGAN_1N_2UAAX_2$ en donde X_1 y X_2 son iguales o diferentes y cada uno es A o G, y N_1 y N_2 son iguales o diferentes y cada uno es A, G, C, U o T; un complejo que contiene el aptámero y una sustancia funcional (por ejemplo, sustancia de afinidad, sustancia para marcación, enzima, medio de aplicación del fármaco, fármaco y similares); un agente farmacéutico o un reactivo que contiene el aptámero o complejo; métodos de detección y

10 purificación de la quimasa usando el aptámero o complejo y similares.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Solicitante: Ribomic Inc.

Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd.

5

<120> Título de la invención: APTÁMERO PARA QUIMASA Y SU USO

<130> Número de referencia: 091555

10

<150> Número de solicitud previa: JP2009-140585

<151> Fecha de presentación de la solicitud previa: 2009-06-11

<160> Número de secuencias: 72

15

<170> Software: PatentIn versión 3.3

<210> SEQ ID NO: 1

<211> Longitud: 70

<212> Tipo: ADN

20

<213> Organismo: Artificial

<220> Característica:

<223> Otra información: templado de ADN para producir el aptámero a quimasa

25

<220> Característica:

<221> Nombre/Clave: característica_misc

<222> Ubicación: (18)..(57)
<223> Otra información: n es a, c, g, ó t

<400> Secuencia: 1

5 gcggcgcgctc ttctatgnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnngaa 60

ttcctaccgt 70

10 <210> SEQ ID NO: 2
<211> Longitud: 33
<212> Tipo: ADN
<213> Organismo: Artificial

15 <220> Característica:
<223> Otra información: cebador para producir aptámero a quimasa

<400> Secuencia: 2

taatacgact cactataggg acggtaggaa ttc 33

20

<210> SEQ ID NO: 3
<211> Longitud: 17
<212> Tipo: ADN
25 <213> Organismo: Artificial

<220> Característica:

<223> Otra información: cebador para producir aptámero a quimasa

<400> Secuencia: 3

gcggcgcgtc ttctatg 17

5

<210> SEQ ID NO: 4

<211> Longitud: 73

<212> Tipo: ARN

10 <213> Organismo: Artificial

<220> Característica:

<223> Otra información: Aptámero a quimasa

15 <400> Secuencia: 4

gggacgguag gaauucgucc auucuacaga uagagauaaa guagaauuuu acaaaacaau 60

gaagagcggc cgc 73

20

<210> SEQ ID NO: 5

<211> Longitud: 72

<212> Tipo: ARN

<213> Organismo: Artificial

25

<220> Característica:

<223> Otra información: Aptámero a quimasa

<400> Secuencia: 5
gggacgguag gaauuccac uugucuuga ggcaagaaau uguauuccga agaagcauag 60

5 aagagcggcc gc 72

<210> SEQ ID NO: 6
<211> Longitud: 73
<212> Tipo: ARN
<213> Organismo: Artificial

10

<220> Característica:
<223> Otra información: Aptámero a quimasa

15

<400> Secuencia: 6
gggacgguag gaauucuacg gucuguguga aaugaaaca cacaagaac aaugacaua 60

gaagagcggc cgc 73

20

<210> SEQ ID NO: 7
<211> Longitud: 73
<212> Tipo: ARN
<213> Organismo: Artificial

25

<220> Característica:

<223> Otra información: Aptámero a quimasa

<400> Secuencia: 7

gggacgguag gaauucaccu uuccaaugu gaaagaaaca caaaaagaaa ugacaucaua 60

5

gaagagcggc cgc 73

<210> SEQ ID NO: 8

10 <211> Longitud: 73

<212> Tipo: ARN

<213> Organismo: Artificial

<220> Característica:

15 <223> Otra información: Aptámero a quimasa

<400> Secuencia: 8

gggacgguag gaauucuacg gucuguguga aaugaaaca caaaagaac aaauaacaua 60

20

gaagagcggc cgc 73

<210> SEQ ID NO: 9

<211> Longitud: 74

25 <212> Tipo: ARN

<213> Organismo: Artificial

<220> Característica:
<223> Otra información: Aptámero a quimasa

<400> Secuencia: 9

5 gggacgguag gaauuccga aaagcaaca gcuugcuaaa augauuccga aaaaacacau 60

agaagagcgg cgc 74

10 <210> SEQ ID NO: 10
 <211> Longitud: 73
 <212> Tipo: ARN
 <213> Organismo: Artificial

15 <220> Característica:
 <223> Otra información: Aptámero a quimasa

<400> Secuencia: 10

 gggacgguag gaauuccgcc gccuaaaaaa cgacgauauu acagaaacgu caaaucacua 60
20
 gaagagcggc cgc 73

 <210> SEQ ID NO: 11
25 <211> Longitud: 73
 <212> Tipo: ARN
 <213> Organismo: Artificial

<220> Característica:
<223> Otra información: Aptámero a quimasa

5 <400> Secuencia: 11
gggacgguag gaauuccga cacgaaugu gugauuaau ccgaacaaca aaguaacaua 60

gaagagcggc cgc 73

10
<210> SEQ ID NO: 12
<211> Longitud: 73
<212> Tipo: ARN
<213> Organismo: Artificial

15
<220> Característica:
<223> Otra información: Aptámero a quimasa

<400> Secuencia: 12
20 gggacgguag gaauucgccg ucaacguuac auaauguaua uaccagggua acuaaaca 60

gaagagcggc cgc 73

25 <210> SEQ ID NO: 13
<211> Longitud: 73
<212> Tipo: ARN

<213> Organismo: Artificial

<220> Característica:

<223> Otra información: Aptámero a quimasa

5

<400> Secuencia: 13

gggacgguag gaauuccgca accaucccggu aacuaugguu agauagaguu aaaaaccaua 60

gaagagcggc cgc 73

10

<210> SEQ ID NO: 14

<211> Longitud: 73

<212> Tipo: ARN

15 <213> Organismo: Artificial

<220> Característica:

<223> Otra información: Aptámero a quimasa

20 <400> Secuencia: 14

gggacgguag gaauucucgu uccugacagc auuugagaua gauuuaaaca aacgcacaua 60

gaagagcggc cgc 73

25

<210> SEQ ID NO: 15

<211> Longitud: 73

<212> Tipo: ARN
<213> Organismo: Artificial

<220> Característica:

5 <223> Otra información: Aptámero a quimasa

<400> Secuencia: 15

gggacgguag gaauucccag aaaauaaaau ccgaagaaaa caacaauuuu ugcaaacaua 60

10 gaagagcggc cgc 73

<210> SEQ ID NO: 16

<211> Longitud: 72

15 <212> Tipo: ARN

<213> Organismo: Artificial

<220> Característica:

<223> Otra información: Aptámero a quimasa

20

<400> Secuencia: 16

gggacgguag gaauucccau gacugaaaaa cgucaguaaa auccgaaaau cauaucauag 60

aagagcggcc gc 72

25

<210> SEQ ID NO: 17

<211> Longitud: 74
<212> Tipo: ARN
<213> Organismo: Artificial

5 <220> Característica:
<223> Otra información: Aptámero a quimasa

<400> Secuencia: 17
gggacgguag gaauuccguu cgcagaaacg aacuuuuaaa aaauguacgu gggagcacau 60
10
agaagagcgg ccgc 74

<210> SEQ ID NO: 18
15 <211> Longitud: 73
<212> Tipo: ARN
<213> Organismo: Artificial

<220> Característica:
20 <223> Otra información: Aptámero a quimasa

<400> Secuencia: 18
gggacgguag gaauucgaac gacaaauuau agaacuucgu uugacauucc acaccacaua 60
25 gaagagcggc cgc 73

<210> SEQ ID NO: 19
<211> Longitud: 73
<212> Tipo: ARN
<213> Organismo: Artificial

5

<220> Característica:
<223> Otra información: Aptámero a quimasa

<400> Secuencia: 19

10 gggacgguag gaauuccac ugcaauucag cagaaaaau uccgaaaaac acacaccaua 60

gaagagcggc cgc 73

15 <210> SEQ ID NO: 20
<211> Longitud: 73
<212> Tipo: ARN
<213> Organismo: Artificial

20 <220> Característica:
<223> Otra información: Aptámero a quimasa

<400> Secuencia: 20

25 gggacgguag gaaucaaaa ucagcugauu uguaauuuuu uuacacaggc aaaacacaua 60

gaagagcggc cgc 73

<210> SEQ ID NO: 21

<211> Longitud: 13

<212> Tipo: ARN

5 <213> Organismo: Artificial

<220> Característica:

<223> Otra información: Secuencia de consenso de Aptámero a quimasa

10

<220> Característica:

<221> Nombre/Clave: característica_misc

<223> Otra información: n es a, c, g, ó t

15

<220> Característica:

<221> Nombre/Clave: característica_misc

<222> Ubicación: (1)..(1)

<223> Otra información: n es a, c, g, ó u

20

<220> Característica:

<221> Nombre/Clave: característica_misc

<222> Ubicación: (8)..(9)

<223> Otra información: n es a, c, g, ó u

25

<220> Característica:

<221> Nombre/Clave: característica_misc

<222> Ubicación: (13)..(13)

<223> Otra información: n es a, c, g, ó u

<400> Secuencia: 21

ngauagannu aan 13

5

<210> SEQ ID NO: 22

<211> Longitud: 73

<212> Tipo: ARN

10 <213> Organismo: Artificial

<220> Característica:

<223> Otra información: Aptámero a quimasa

15 <400> Secuencia: 22

gggacggguag gaauuccgga cacaaaugu gugauuaauu ccgaacaaca aaguaacaua 60

gaagagcggc cgc 73

20

<210> SEQ ID NO: 23

<211> Longitud: 73

<212> Tipo: ARN

<213> Organismo: Artificial

25

<220> Característica:

<223> Otra información: Aptámero a quimasa

<400> Secuencia: 23
gggacgguag gaauucauau guacuccguc cugacaaaau gucaaugaca aacguucaua 60

5 gaagagcggc cgc 73

<210> SEQ ID NO: 24
<211> Longitud: 72
<212> Tipo: ARN
<213> Organismo: Artificial

10 <220> Característica:
<223> Otra información: Aptámero a quimasa

15 <400> Secuencia: 24
gggacgguag gaauucccuu cauaguagaa uguugguuuc uacaaaagcg acaagcauag 60

20 aagagcggcc gc 72

<210> SEQ ID NO: 25
<211> Longitud: 73
<212> Tipo: ARN
25 <213> Organismo: Artificial

<220> Característica:

<223> Otra información: Aptámero a quimasa

<400> Secuencia: 25

gggacgguag gaauucagcu gacuccaauug cacacguaga uagaguuaaa acguugcaua 60

5

gaagagcggc cgc 73

<210> SEQ ID NO: 26

10 <211> Longitud: 73

<212> Tipo: ARN

<213> Organismo: Artificial

<220> Característica:

15 <223> Otra información: Aptámero a quimasa

<400> Secuencia: 26

gggacgguag gaauucgucg auucuacaga uagagauaaa guagaauuuu acaaaacaua 60

20

gaagagcggc cgc 73

<210> SEQ ID NO: 27

<211> Longitud: 73

25 <212> Tipo: ARN

<213> Organismo: Artificial

<220> Característica:
<223> Otra información: Aptámero a quimasa

<400> Secuencia: 27

5 gggacgguag gaauuccguc aucgguugca aaugaaaau acaaaacaag gacaaccaua 60

gaagagcggc cgc 73

10 <210> SEQ ID NO: 28
<211> Longitud: 73
<212> Tipo: ARN
<213> Organismo: Artificial

15 <220> Característica:
<223> Otra información: Aptámero a quimasa

<400> Secuencia: 28

gggacgguag gaauucaauu ucuuucuaau cucaccugag uaauucaggc acaguacaua 60

20

gaagagcggc cgc 73

<210> SEQ ID NO: 29
25 <211> Longitud: 73
<212> Tipo: ARN
<213> Organismo: Artificial

<220> Característica:
<223> Otra información: Aptámero a quimasa

5 <400> Secuencia: 29
gggacgguag gaauucacga cgcgccaaaa aauggugaca uuuuagaaac accgaacaua 60

gaagagcggc cgc 73

10
<210> SEQ ID NO: 30
<211> Longitud: 71
<212> Tipo: ARN
<213> Organismo: Artificial

15
<220> Característica:
<223> Otra información: Aptámero a quimasa

<400> Secuencia: 30
20 gggacgguag gaauucgucc cucuugucua uuuugcagau agacuuaaag caaacauaga 60

agagcggccg c 71

25 <210> SEQ ID NO: 31
<211> Longitud: 71
<212> Tipo: ARN

<213> Organismo: Artificial

<220> Característica:

<223> Otra información: Aptámero a quimasa

5

<400> Secuencia: 31

gggacgguag gaauucgucc cucaugucua uuugcagau agacuuaaag caacauaga 60

agagcggccg c 71

10

<210> SEQ ID NO: 32

<211> Longitud: 70

<212> Tipo: ARN

15 <213> Organismo: Artificial

<220> Característica:

<223> Otra información: Aptámero a quimasa

20 <400> Secuencia: 32

gggacgguag gaauucgucc ucaugucua uuugcagau gacuuaaagc aaacauagaa 60

gagcggccgc 70

25

<210> SEQ ID NO: 33

<211> Longitud: 73

<212> Tipo: ARN
<213> Organismo: Artificial

<220> Característica:

5 <223> Otra información: Aptámero a quimasa

<400> Secuencia: 33

gggacgguag gaauuccugu cuuuucccac gcaacaaauu acagagcuuu gcaaaacaua 60

10 gaagagcggc cgc 73

<210> SEQ ID NO: 34
<211> Longitud: 73
15 <212> Tipo: ARN
<213> Organismo: Artificial

<220> Característica:
<223> Otra información: Aptámero a quimasa

20

<400> Secuencia: 34

gggacgguag gaauucugcc gcaacccaau gaaaacgaag auagagauaa aucgaacaua 60

gaagagcggc cgc 73

25

<210> SEQ ID NO: 35

<211> Longitud: 72
<212> Tipo: ADN
<213> Organismo: Artificial

5 <220> Característica:
<223> Otra información: templado de ADN para producir aptámero a quimasa

<220> Característica:
10 <221> Nombre/Clave: característica_misc
<222> Ubicación: (20)..(49)
<223> Otra información: n es a, c, g, ó t

<400> Secuencia: 35

15 tcacactagc acgcataggn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnc atctgacctc 60

tctcctgctc cc 72

20 <210> SEQ ID NO: 36
<211> Longitud: 40
<212> Tipo: ADN
<213> Organismo: Artificial

25 <220> Característica:
<223> Otra información: primer for producing Aptámero a quimasa

<400> Secuencia: 36
taatacgact cactataggg agcaggagag aggtcagatg 40

5 <210> SEQ ID NO: 37
<211> Longitud: 19
<212> Tipo: ADN
<213> Organismo: Artificial

10 <220> Característica:
<223> Otra información: primer for producing Aptámero a quimasa

<400> Secuencia: 37
tcacactagc acgcatagg 19

15

<210> SEQ ID NO: 38
<211> Longitud: 72
<212> Tipo: ARN
20 <213> Organismo: Artificial

<220> Característica:
<223> Otra información: Aptámero a quimasa

25 <400> Secuencia: 38
gggagcagga gagaggucag auggauagag uuaagaucug gcuggcgcau uagccuaugc 60

22

gugcuagugu ga

72

<210> SEQ ID NO: 39

5 <211> Longitud: 72

<212> Tipo: ARN

<213> Organismo: Artificial

<220> Característica:

10 <223> Otra información: Aptámero a quimasa

<400> Secuencia: 39

gggagcagga gagaggucag augguuacgg auagaguuaa gguaacggua cggccuaugc 60

15 gugcuagugu ga

72

<210> SEQ ID NO: 40

<211> Longitud: 73

20 <212> Tipo: ARN

<213> Organismo: Artificial

<220> Característica:

<223> Otra información: Aptámero a quimasa

25

<400> Secuencia: 40

gggagcagga gagaggucag augaacggau agagcuaaga guucgucaga ggggccuaug 60

cgugcuagug uga 73

- 5 <210> SEQ ID NO: 41
- <211> Longitud: 72
- <212> Tipo: ARN
- <213> Organismo: Artificial

- 10 <220> Característica:
- <223> Otra información: Aptámero a quimasa

<400> Secuencia: 41
gggagcagga gagaggucag auggugagau agaguuaaac accacaauag uagccuaugc 60

- 15
- gugcuagugu ga 72

- <210> SEQ ID NO: 42
- 20 <211> Longitud: 72
- <212> Tipo: ARN
- <213> Organismo: Artificial

- <220> Característica:
- 25 <223> Otra información: Aptámero a quimasa

<400> Secuencia: 42

gggagcagga gagaggucag augcgugauc gugcaaggcg gauagaguua aggccuauhc 60

gugcuagugu ga 72

5

- <210> SEQ ID NO: 43
- <211> Longitud: 72
- <212> Tipo: ARN
- <213> Organismo: Artificial

10

- <220> Característica:
- <223> Otra información: Aptámero a quimasa

<400> Secuencia: 43

15 gggagcagga gagaggucag augaugccaa gauagauuuu aauggcguuu gggccuauhc 60

gugcuagugu ga 72

20

- <210> SEQ ID NO: 44
- <211> Longitud: 72
- <212> Tipo: ARN
- <213> Organismo: Artificial

25

- <220> Característica:
- <223> Otra información: Aptámero a quimasa

<400> Secuencia: 44

gggagcagga gagaggucag auguuagacc aaagcauagg agauagaguu aaaccuaugc 60

gugcuagugu ga 72

5

<210> SEQ ID NO: 45

<211> Longitud: 72

<212> Tipo: ARN

10 <213> Organismo: Artificial

<220> Característica:

<223> Otra información: Aptámero a quimasa

15 <400> Secuencia: 45

gggagcagga gagaggucag auggaccacc gaugggcaag auagaguuaa augccuaugc 60

gugcuagugu ga 72

20

<210> SEQ ID NO: 46

<211> Longitud: 72

<212> Tipo: ARN

<213> Organismo: Artificial

25

<220> Característica:

<223> Otra información: Aptámero a quimasa

gggagcagga gagaggucag augggacaga uagaguuaaa guccguuacg uggccuaugc 60

<211> Longitud: 72

<213> Organismo: Artificial

<223> Otra información: Aptámero a quimasa

<400> Secuencia: 47

gggagcagga gagaggucag auggugauag auagaguuaa aaucgcugaa uggccuaugc 60

20

<211> Longitud: 72

<212> Tipo: ARN

25 <213> Organismo: Artificial

<220> Característica:

<223> Otra información: Aptámero a quimasa

<400> Secuencia: 48

gggagcagga gagaggucag augugaagau agagauaaau cacauacagu cggccuaugc 60

5

gugcuagugu ga 72

<210> SEQ ID NO: 49

10 <211> Longitud: 29

<212> Tipo: ARN

<213> Organismo: Artificial

<220> Característica:

15 <223> Otra información: Aptámero a quimasa

<400> Secuencia: 49

gguucuacag auagagauaa aguagaacc 29

20

<210> SEQ ID NO: 50

<211> Longitud: 35

<212> Tipo: ARN

<213> Organismo: Artificial

25

<220> Característica:

<223> Otra información: Aptámero a quimasa

<400> Secuencia: 50
ggcauucuaac agauagagau aaaguagaau uuaac 35

5

<210> SEQ ID NO: 51
<211> Longitud: 45
<212> Tipo: ARN
<213> Organismo: Artificial

10

<220> Característica:
<223> Otra información: Aptámero a quimasa

<400> Secuencia: 51
15 cguuacauaa uguauauacc aggguaacua aacauagaag agcgg 45

<210> SEQ ID NO: 52
<211> Longitud: 26
20 <212> Tipo: ARN
<213> Organismo: Artificial

<220> Característica:
<223> Otra información: Aptámero a quimasa

25

<400> Secuencia: 52
ccguauauac caggguaacu aaacgg 26

5

<210> SEQ ID NO: 53

<211> Longitud: 42

<212> Tipo: ARN

<213> Organismo: Artificial

10

<220> Característica:

<223> Otra información: Aptámero a quimasa

<400> Secuencia: 53

ggguaacuau gguuagauag aguuaaaaac cauagaagac cc42

15

<210> SEQ ID NO: 54

<211> Longitud: 36

<212> Tipo: ARN

<213> Organismo: Artificial

20

<220> Característica:

<223> Otra información: Aptámero a quimasa

<400> Secuencia: 54

uaacuauggu uagauagagu uaaaaaccau agaaga36

25

<210> SEQ ID NO: 55

<211> Longitud: 29
<212> Tipo: ARN
<213> Organismo: Artificial

5 <220> Característica:
<223> Otra información: Aptámero a quimasa

<400> Secuencia: 55

cuaugguuag auagaguuaa aaaccgauag 29

10

<210> SEQ ID NO: 56
<211> Longitud: 23
<212> Tipo: ARN
15 <213> Organismo: Artificial

<220> Característica:
<223> Otra información: Aptámero contra quimasa

20 <400> Secuencia: 56
ggguuagaua gaguuaaaaa ccc 23

<210> SEQ ID NO: 57

25 <211> Longitud: 27
<212> Tipo: ARN
<213> Organismo: Artificial

<220> Característica:
<223> Otra información: Aptámero contra quimasa

5 <400> Secuencia: 57
gcuuuugaga uaguuuuaaa caaacgc 27

<210> SEQ ID NO: 58
10 <211> Longitud: 23
<212> Tipo: ARN
<213> Organismo: Artificial

<220> Característica:
15 <223> Otra información: Aptámero contra quimasa

<400> Secuencia: 58
ggguugaaga uauuuuagaa ccc 23

20
<210> SEQ ID NO: 59
<211> Longitud: 23
<212> Tipo: ARN
<213> Organismo: Artificial

25
<220> Característica:
<223> Otra información: Aptámero contra quimasa

<400> Secuencia: 59
ggguuagaua gagauaaaaa ccc 23

5

<210> SEQ ID NO: 60
<211> Longitud: 23
<212> Tipo: ARN
<213> Organismo: Artificial

10

<220> Característica:
<223> Otra información: Aptámero contra quimasa

<400> Secuencia: 60
15 ggguuagaua gagcuaaaaa ccc 23

<210> SEQ ID NO: 61
<211> Longitud: 23
20 <212> Tipo: ARN
<213> Organismo: Artificial

<220> Característica:
<223> Otra información: Aptámero contra quimasa

25

<400> Secuencia: 61
ggguuagaua gauuuaaaaa ccc 23

<210> SEQ ID NO: 62
<211> Longitud: 23
5 <212> Tipo: ARN
<213> Organismo: Artificial

<220> Característica:
<223> Otra información: Aptámero contra quimasa

10

<400> Secuencia: 62
ggguuggaua gaguuaagaa ccc 23

15 <210> SEQ ID NO: 63
<211> Longitud: 23
<212> Tipo: ARN
<213> Organismo: Artificial

20 <220> Característica:
<223> Otra información: Aptámero contra quimasa

<400> Secuencia: 63
gcuacagaua gaguuaaagu agc 23

25

<210> SEQ ID NO: 64

<211> Longitud: 23
<212> Tipo: ARN
<213> Organismo: Artificial

5 <220> Característica:
<223> Otra información: Aptámero contra quimasa

<400> Secuencia: 64
gucacagaua gaguuaaagu gac 23

10

<210> SEQ ID NO: 65
<211> Longitud: 19
<212> Tipo: ARN
15 <213> Organismo: Artificial

<220> Característica:
<223> Otra información: Aptámero contra quimasa

20 <400> Secuencia: 65
ggcagauaga guuaaagcc 19

<210> SEQ ID NO: 66
25 <211> Longitud: 23
<212> Tipo: ARN
<213> Organismo: Artificial

<220> Característica:
<223> Otra información: Aptámero contra quimasa

5 <400> Secuencia: 66
ggguuagauc gaguuaaaaa ccc 23

<210> SEQ ID NO: 67
10 <211> Longitud: 23
<212> Tipo: ARN
<213> Organismo: Artificial

<220> Característica:
15 <223> Otra información: Aptámero contra quimasa

<400> Secuencia: 67
ggguuagaua caguuaaaaaa ccc 23

20
<210> SEQ ID NO: 68
<211> Longitud: 23
<212> Tipo: ARN
<213> Organismo: Artificial

25
<220> Característica:
<223> Otra información: Aptámero contra quimasa

<400> Secuencia: 68

ggguuagaua guguuaaaaa ccc

23

5

<210> SEQ ID NO: 69

<211> Longitud: 26

<212> Tipo: ARN

<213> Organismo: Artificial

10

<220> Característica:

<223> Otra información: Aptámero contra quimasa

<400> Secuencia: 69

15 aaaggguuag auagaguuaa aaaccc

26

<210> SEQ ID NO: 70

<211> Longitud: 23

20 <212> Tipo: ADN

<213> Organismo: Artificial

<220> Característica:

<223> Otra información: Aptámero contra quimasa

25

<400> Secuencia: 70

gggtagaua gaguuaaaaa ccc

23

<210> SEQ ID NO: 71

<211> Longitud: 23

5 <212> Tipo: ADN

<213> Organismo: Artificial

<220> Característica:

<223> Otra información: Aptámero contra quimasa

10

<400> Secuencia: 71

ggguuagaua gagtuaaaaaa ccc 23

<210> SEQ ID NO: 72

15 <211> Longitud: 23

<212> Tipo: ADN

<213> Organismo: Artificial

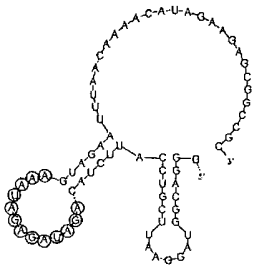
<220> Característica:

20 <223> Otra información: Aptámero contra quimasa

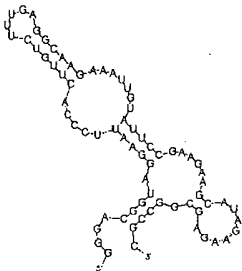
<400> Secuencia: 72

gggtagaua gagtuaaaaaa ccc 23

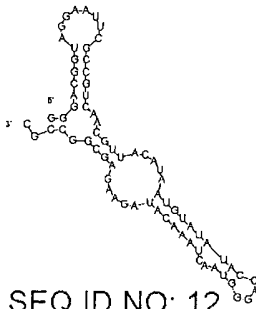
FIG. 1



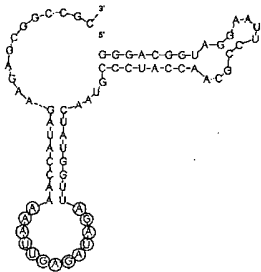
SEQ ID NO: 4



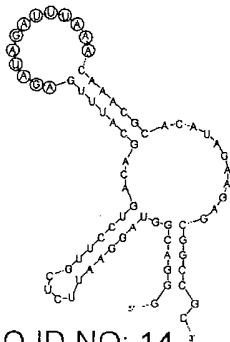
SEQ ID NO: 5



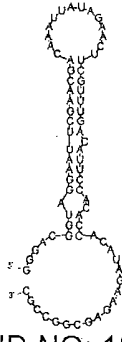
SEQ ID NO: 12



SEQ ID NO: 13



SEQ ID NO: 14



SEQ ID NO: 18

FIG. 2

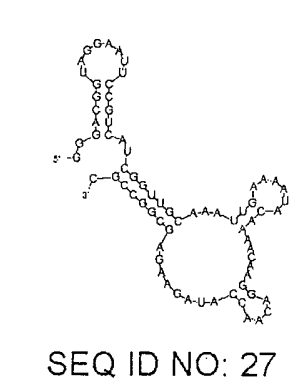
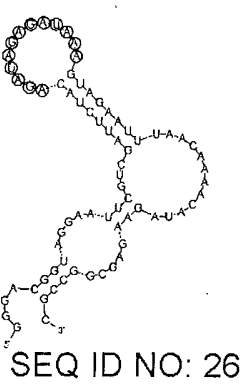
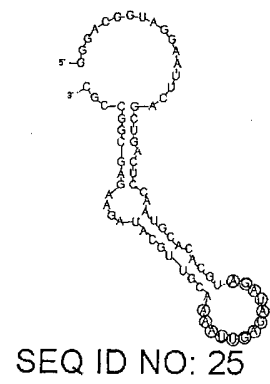
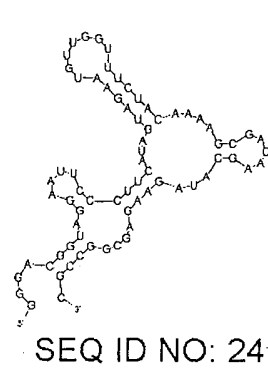
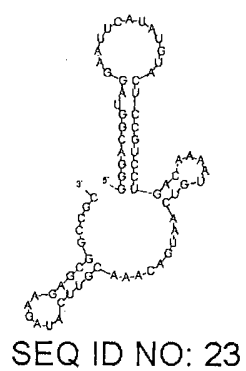
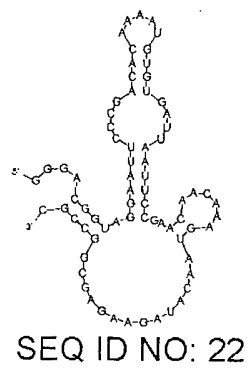
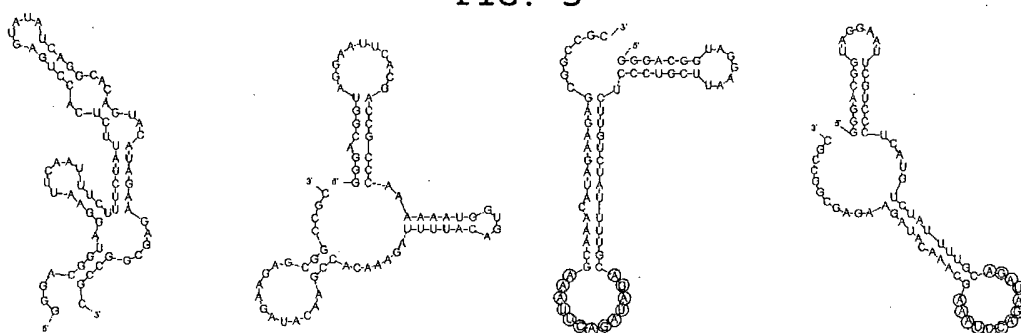
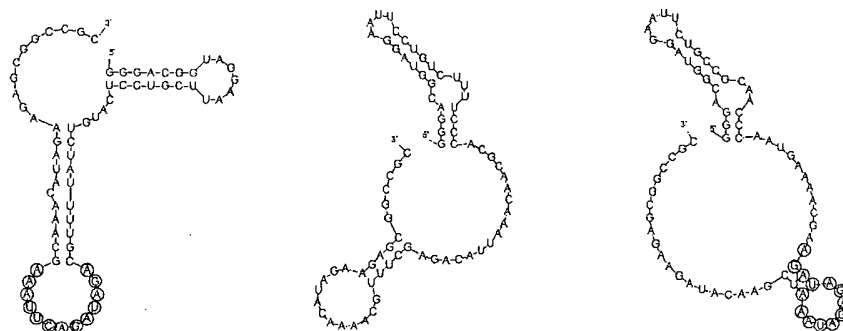


FIG. 3



SEQ ID NO: 28 SEQ ID NO: 29 SEQ ID NO: 30 SEQ ID NO: 31



SEQ ID NO: 32

SEQ ID NO: 33

SEQ ID NO: 34

FIG. 4

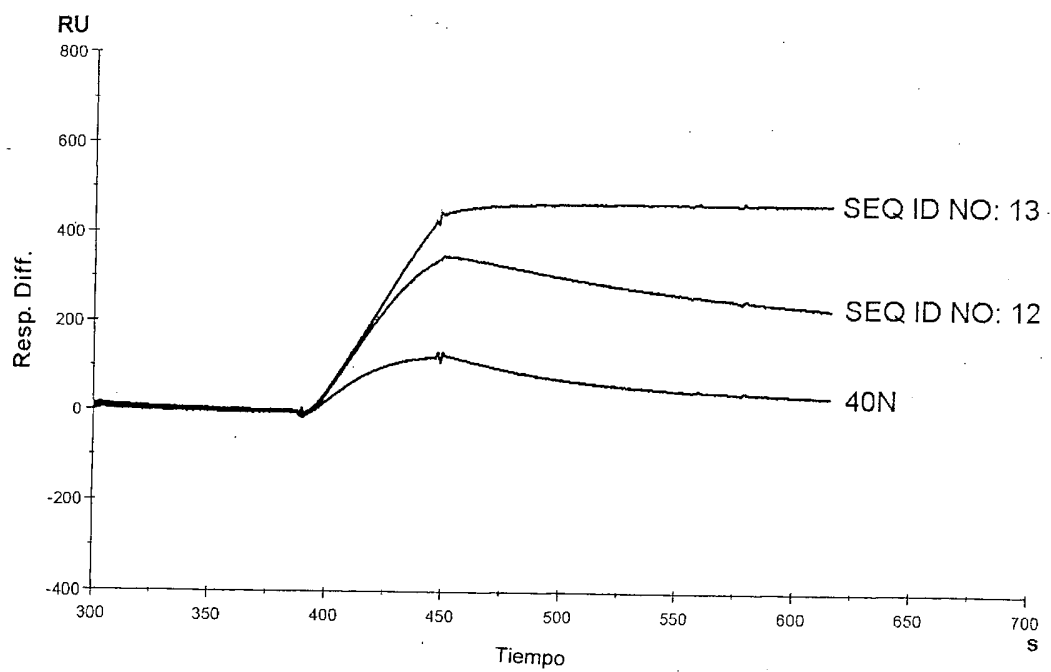


FIG. 5

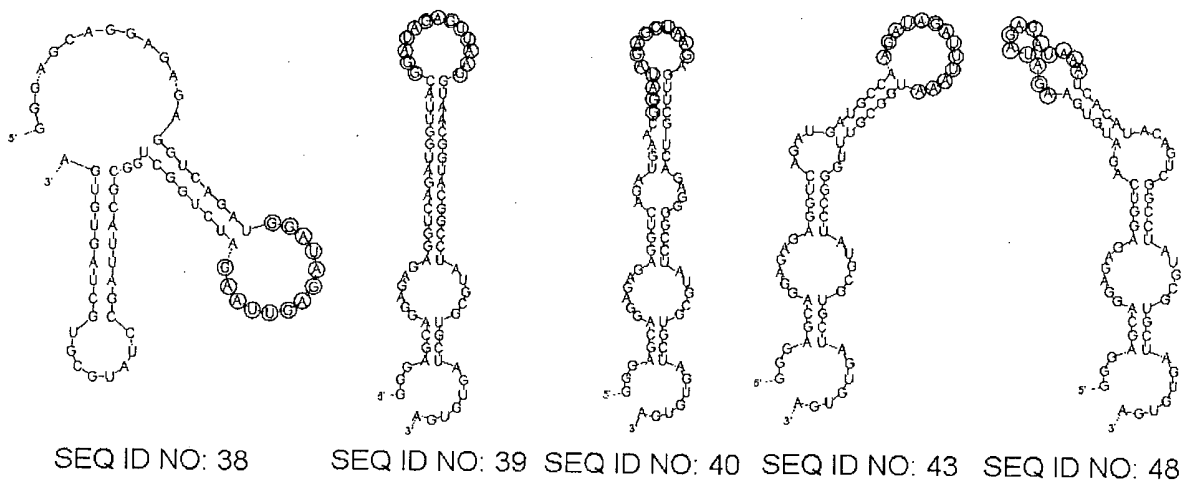


FIG. 7

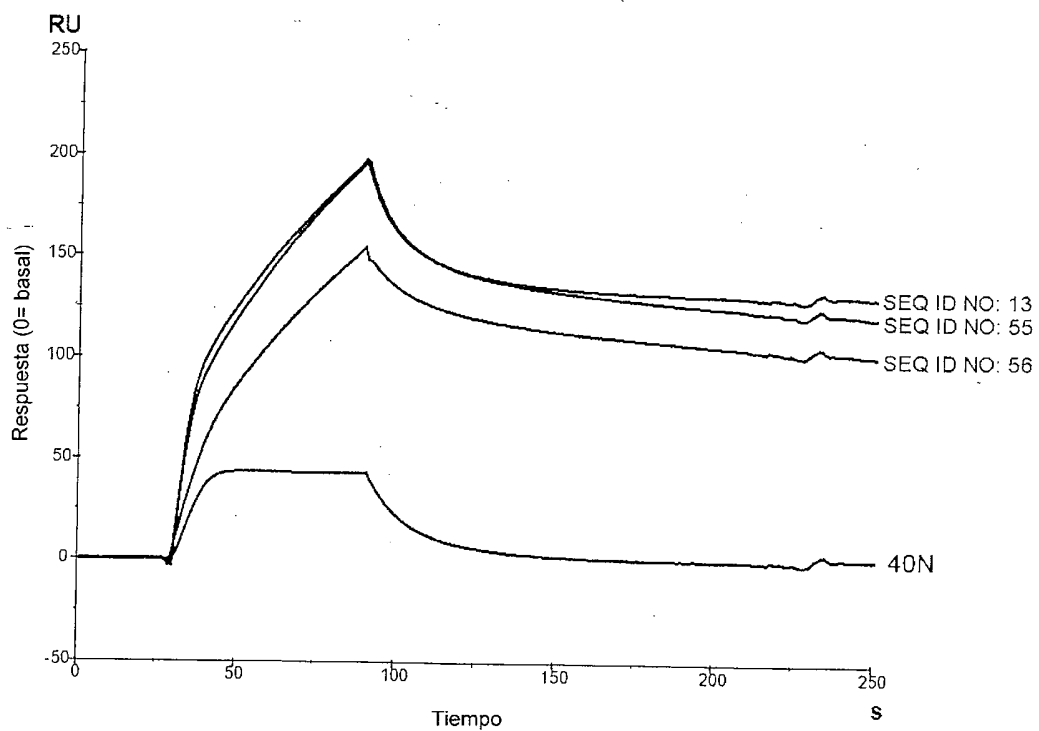
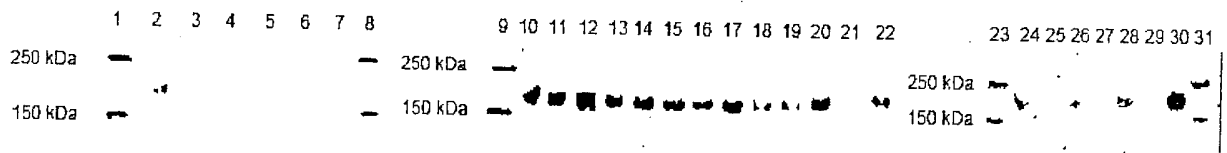


FIG. 8



 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISION DE NUEVAS CREACIONES TARJETA ARCHIVO PROPIETARIOS					
PATENTE DE INVENCION ____		PCT <u>X</u>		MODELO DE UTILIDAD ____		DISEÑO INDUSTRIAL ____	
(21) N° de solicitud:				(22) Fecha de solicitud:			
(51) Clasificación Internacional :							
(71) Solicitante(s) RIBOMIC INC. y OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD.							
(72) Inventor(es) YOSHIKAZU NAKAMURA, LING JIN, SATOKO YAMAZAKI, HISAKO IKEDA, MASAHIRO MURAGUCHI							
(74) Apoderado: DRA. MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO							
(30) Prioridad	(31)	No. Prioridad	(32)	Fecha	(33)	País	
		2009-140585		11/06/2009		JP	
(85) Fecha inicio fase nacional:				(87) Publicación internacional			
(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT				Fecha: 16/12/2010			
Fecha de presentación de la solicitud: 11/06/2010				N° publicación: WO 2010/143714 A1			
No. de solicitud PCT/JP2010/059953							
(54) Título: APTAMERO PARA QUIMASA Y SU USO							

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES
EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN
SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT

(21) N° de solicitud: 22) Fecha de solicitud: (30) Prioridad (31) N° Prioridad 32) Fecha (33) Pais 2009-140585 11/06/2009 JP	(51) int. Cl.: (71) Solicitante(s) RIBOMIC INC OTZUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD. (72) Inventor(es) YOSHIKAZU NAKAMURA LING JIN SATOKO YAMAKAZI Y OTROS (74) Apoderado: MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO
(85) Fecha limite inicio fase nacional: (86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT Fecha de presentación de la solicitud: 11/06/2010 N° de solicitud PCT/JP2010/059953	(87) Publicación internacional Fecha: 16/12/2010 N° publicación: WO 2010/143714 A1
(54) Titulo: APTAMERO PARA QUIMASA Y SU USO	

Reivindicación(es):

1. Un aptámero que se une a quimasa para inhibir la actividad de quimasa.
2. El aptámero de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado además porque comprende una secuencia de nucleótidos representada por $X_1GAUAGAN_1N_2UAAX_2$ (SEQ ID NO: 21; cada uno de X_1 y X_2 , sea idéntico o no, es A o G, y cada uno de N_1 y N_2 , sea idéntico o no, es A, G, C, U o T).
3. El aptámero de conformidad con la reivindicación 2, caracterizado además porque N_1N_2 es GA, GU, GC, UU, GT o CU.
4. El aptámero de conformidad con la reivindicación 2, caracterizado además porque X_1 y X_2 son ambos A o ambos G.
5. El aptámero de conformidad con la reivindicación 3 ó 4, caracterizado además porque al menos uno de los nucleótidos pirimidínicos ha sido modificado o alterado.
6. El aptámero de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado además porque comprende cualquiera de las secuencias de nucleótidos (a), (b) y (c) siguientes: (a) un aptámero que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada entre SEQ ID NO: 4-34, 38-57, 59-65 y 69-72 (con la condición de que el uracilo puede ser timina); (b) un aptámero que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada entre SEQ ID NO: 4-34, 38-57, 59-65 y 69-72 (con la condición de que el uracilo puede ser timina), en donde 1 a 5 nucleótidos están sustituidos, suprimidos, insertado o adicionados; y (c) una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de 70% o más a una secuencia de nucleótidos seleccionada entre SEQ ID NO: 4-34, 38-57, 59-65 y 69-72 (con la condición de que el uracilo puede ser timina).
7. El aptámero de conformidad con la reivindicación 6, caracterizado además porque al menos uno de los nucleótidos contenidos en el aptámero ha sido modificado o alterado.
8. El aptámero de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado además porque comprende cualquiera de las secuencias de nucleótidos (a'), (b') y (c') siguientes: (a') una secuencia de nucleótidos seleccionada entre SEQ ID NO: 56(1)-56(7), 56(9), 56(11), 56(12), 56(15)-56(52), 61(1), 69(1), 69(2), y 72(1)-72(8) (con la condición de que el uracilo puede ser timina); (b') una secuencia de nucleótidos seleccionada entre SEQ ID NO: 56(1)-56(7), 56(9), 56(11), 56(12), 56(15)-56(52), 61(1), 69(1), 69(2), y 72(1)-72(8) (con la condición de que el uracilo puede ser timina), en donde 1 a 5 nucleótidos están sustituidos, suprimidos, insertado o adicionados; y (c') una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de 70%

- o más a una secuencia de nucleótidos seleccionada entre SEQ ID NO: 56(1)-56(7), 56(9), 56(11), 56(12), 56(15)-56(52), 61(1), 69(1), 69(2), y 72(1)-72(8) (con la condición de que el uracilo puede ser timina).
9. El aptámero de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado además porque cada uno de los grupo hidroxilo de las posiciones 2' de los nucleótidos pirimidínicos respectivos contenidos en el aptámero, sea idéntico o no, se pueden sustituir con un átomo o un grupo seleccionado del grupo que consiste en un átomo de hidrógeno, un átomo de flúor y un grupo metoxi.
10. El aptámero de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado además porque cada uno de los grupos hidroxilo en las posiciones 2' de los respectivos nucleótidos purínicos contenidos en el aptámero, sea idéntico o no, se puede sustituir con un átomo o grupo seleccionado del grupo que consiste en a átomo de hidrógeno, un átomo de flúor y un grupo metoxi.
11. Un complejo que comprende el aptámero de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 y una sustancia funcional.
12. El complejo de conformidad con la reivindicación 11, caracterizado además porque la sustancia funcional es una sustancia de afinidad, una sustancia para marcación, una enzima, un vehículo de administración de fármaco o un fármaco.
13. Un agente farmacéutico que comprende el aptámero de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 o el complejo de la reivindicación 11 ó 12.
14. El agente farmacéutico de conformidad con la reivindicación 13, caracterizado además porque se usa para prevenir o tratar una enfermedad cardiovascular o fibrosis.
15. Un reactivo de diagnóstico que comprende el aptámero de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 o el complejo de la reivindicación 11 ó 12.
16. Una sonda de detección de quimasa que comprende el aptámero de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 o el complejo de la reivindicación 11 ó 12.
17. Un portador de fase sólida para purificación de quimasa que comprende el aptámero de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 o el complejo de la reivindicación 11 ó 12.
18. Un método de detectar quimasa, que comprende usar el aptámero de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 o el complejo de la reivindicación 11 ó 12.

1111



No. 11-180116- -00000-0000

Fecha: 2011-12-28 15:28:15 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 266LISTA DE CHEQUEO
ADMISION A TRAMITE - NUEVAS CREACIONESPATENTE DE INVENCION ☐ MODELO DE UTILIDAD ☐ Art. 33 Decisión 486/00

- ☐ Indicación que se solicita una patente
☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐ Descripción de la invención
☐ Dibujos de ser estos pertinentes
☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)

Completa ☐Incompleta ☐PATENTE DE INVENCION PCT ☒ MODELO DE UTILIDAD PCT ☐ Art. 33 Decisión 486/00
Circular Única

- ☒ Indicación que se solicita una PCT
☒ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☒ Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
☒ Dibujos de ser estos pertinentes
☒ Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)

Completa ☒Incompleta ☐DISEÑO INDUSTRIAL ☐ (Art. 119 Decisión 486/00)

- ☐ Indicación que se solicita diseño industrial
☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐ Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño
☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐Incompleta ☐ESQUEMA DE TRAZADO ☐ (Art. 92 Decisión 486/00)

- ☐ Indicación que se solicita un esquema de trazado
☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐ Representación gráfica de un esquema de trazado
☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐Incompleta ☐