06 100210

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

BT

Delegatura de propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

PCT

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCIÓN

21. **EXPEDIENTE No.** 06-100210

54. **TÍTULO** ANTAGONISTAS PARA LA FAMILIA CITOQUINA IL-12 HUMANA Y SU USO COMO TERAPEUTICOS PARA ENFERMEDADES AUTOINMUNES

51. **CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL** A61K 39/395

71. **SOLICITANTE** ARCHEMIX CORP

DOMICILIO CAMBRIDGE, MA USA

74. **APODERADO** DILIA MARIA RODRIGUEZ D'ALEMAN

22. **BOGOTÁ, D. C.,** OCTUBRE 4/2006

(FORMA P-10)

PETITORIO

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 05-10-006711-00000-0000
Fec 2005-10-04 15 44 59 Dep 2020 NUEVAS SOLICITUDES
Fol 11 PATENTES
Exe 370 PATENTES NAL
Act 411 PRESENTACION Folios 594

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

1

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE PCT ENTRADA EN FASE NACIONAL

05-10-06

1) SOLICITUD DE:

☒ Patente de invención ☐ Patente de Modelo de Utilidad

☒ Capitulo I. ☐ Capitulo II.

2) SOLICITANTE (71)	**Nombre: ARCHEMIX CORP.** **Dirección: One Hampshire Street, Cambridge, MA 02139 USA** **Nacionalidad o domicilio: Cambridge, MA, USA** **Lugar de constitución: MA, USA**	**IDENTIFICACIÓN** **C.C.** ☐ **NIT:** ☐ **C.E.** ☐ **OTRO** ☐ **Cual** _____ **NÚMERO** _____
	Teléfono: **Fax:** **E. Mail:**	
3) REPRESENTANTE O APODERADO	Nombre: DILIA MARÍA RODRÍGUEZ D´ALEMAN Dirección: Carrera 11 N°. 86-53 Piso 6 Bogotá D.C. Teléfono: 6181088 Fax: 6350824 E. Mail: info@clarkemodet.com.co	**IDENTIFICACIÓN** **C.C.** ☒ **NIT:** ☐ **C.E.** ☐ **OTRO** ☐ **NÚMERO:** 41.654.882 **TP:** 20824 CSJ
4) INVENTOR (ES) (72)	**Nombre: 1. DIENER, John,L; 2. FERGUSON, Alicia; 3. HAMAGUCHI, Nobuko; 4. KEENE, Sara Chesworth; 5. LAGASSE, H., A., Daniel; 6. SAWHNEY, Pooja; 7. THOMSON, Kristin.** **Dirección: 1. 87 Bristol Street, Unit 1B, Cambridge, MA 02139 USA; 2. 162 Summer Street #33, Somerville, MA 02143 USA; 3. 7 Dartmouth Drive, Framigham, MA 01701, USA; 4. 120 Lancaster Drive, Tewksbury, MA 01876 USA; 5. 112 Highland Avenue, Apt. F, Somerville, MA 02143 USA; 6. 276 Massachusetts Avenue, Apt.- 511, Arlington, MA 02474 USA; 7. 15 College Avenue, Arlington, MA 02474 USA** **Nacionalidad o Domicilio: Todos los anteriores, Estadounidenses**	

5) PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/US2005/007666 Fecha: Marzo 7, 2005

Publicación Internacional No. WO2005/086835 A2 Fecha: Sept. 22, 2005

6)Título (54) APTÁMEROS PARA LA FAMILIA CITOQUINA IL-12 HUMANA Y SU USO COMO TERAPÉUTICOS PARA ENFERMEDADES AUTOINMUNES

7) Clasificación Internacional: SIN CLASIFICACIÓN A61K 39/395 AC

8) PRIORIDAD SI ☒ NO ☐	**33) País de Origen**	**(32) Fecha**	**(31) Número de Solicitud**
	Estados Unidos	**Marzo 5, 2004**	**60/550,962 (CON)**
	Estados Unidos	**Sept. 7, 2004**	**60/608,046 (CON)**

9) Comprobante de pago N°. 06-73723 **Fecha:** Sept. 25/06

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario. Ver reverso de esta pagina

9

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 06-100210- -00000-0000
Fec: 2006-10-04 16:44:59 Dep: 2050 RECREACIONES
Tra: 11 PATENTES
Eje: 376 FASENACIONAL
Act: 411 PRESENTACION Folios: 594

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 06 - 73,723
FECHA : SEPTIEMBRE 25 DE 2006

C O N S I G N A C I O N

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CLARKE MODET Y CO. COLOMBCONSIGNACION		BANCO POPULAR	050-00110-6	53267312	25/09/2006	12,981,000.00

C O N C E P T O

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	463,000.00
		TOTAL : $	463,000.00

SON: CUATROCIENTOS SESENTA Y TRES MIL PESOS

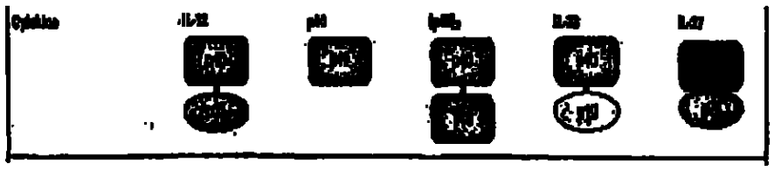
RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No.

10) ANEXOS

- [X] Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- [ ] Comprobante de pago por reivindicación de prioridad
- [ ] Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona Jurídica
- [ ] Poderes, si fuera el caso
- [ ] Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante
- [ ] *Declaraciones*
- [X] Copia de la solicitud Internacional. (Resumen, descripción, reivindicación, Dibujos).
- [X] Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicación, Dibujos)
- [ ] Copia del examen preliminar 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 12 x 12 y 6 x 6 cm
- [ ] De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionados parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- [X] Otros:
  1. Notificación de la recepción de la Prioridad
  2. Notificación de cambios internacionales

11) FIGURA CARACTERÍSTICA:



12) Solicitud concesión de la patente,

NOMBRE: DILIA RODRÍGUEZ D´ALEMAN

FIRMA:

C.C. 41.654.882 de Bogota TP 20824 CSJ

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario. Ver reverso de esta pagina

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
22 September 2005 (22.09.2005)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2005/086835 A2

(51) International Patent Classification: Not classified

(21) International Application Number:
PCT/US2005/007666

(22) International Filing Date: 7 March 2005 (07.03.2005)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/550,962 5 March 2004 (05.03.2004) US
60/608,046 7 September 2004 (07.09.2004) US

(63) Related by continuation (CON) or continuation-in-part (CIP) to earlier applications:
US 60/550,962 (CON)
Filed on 5 March 2004 (05.03.2004)
US 60/608,046 (CON)
Filed on 7 September 2004 (07.09.2004)

(71) Applicant *(for all designated States except US)*: ARCHEMIX CORP. [US/US]; One Hampshire Street, Cambridge, MA 02139 (US).

(72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants *(for US only)*: CLOAD, Sharon, T. [US/US]; 7 Granville Road, Cambridge, MA 02138 (US). DIENER, John, L. [US/US]; 87 Bristol Street, Unit 1B, Cambridge, MA 02139 (US). FERGUSON, Alicia [US/US]; 162 Summer Street #33, Somerville, MA 02143 (US). HAMAGUCHI, Nobuko [JP/US]; 7 Dartmouth Drive, Framingham, MA 01701 (US). KEENE, Sara, Chesworth [US/US]; 120 Lancaster Drive, Tewksbury, MA 01876 (US). LAGASSE, H., A., Daniel [US/US]; 112 Highland Avenue, Apt. F, Somerville, MA 02143 (US). SAWHNEY, Pooja [US/US]; 276 Massachusetts Avenue, Apt. 511, Arlington, MA 02474 (US). THOMPSON, Kristin [US/US]; 15 College Avenue, Arlington, MA 02474 (US).

(74) Agent: ELRIFI, Ivor, R.; Mintz, Levin, Cohn, Ferris, Glovsky and Popeo PC, One Financial Center, Boston, MA 02111 (US).

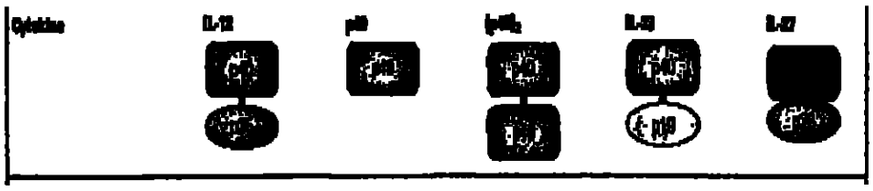
(81) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of national protection available)*: AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US (patent), UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:
— *without international search report and to be republished upon receipt of that report*

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: APTAMERS TO THE HUMAN IL-12 CYTOKINE FAMILY AND THEIR USE AS AUTOIMMUNE DISEASE THERAPHUTICS



(57) Abstract: The present invention provides materials and methods to treat immune disease in which cytokines are involved in pathogenesis. The materials and methods of the present invention are useful in the treatment of autoimmune diseases. The materials and methods of the present invention are directed to nucleic acid ligands capable of binding to human IL-23 and/or human IL-12 cytokines and thus modulate their biological activity and are useful as therapeutic agents in immune, auto-immune and cancer therapeutics.

WO 2005/086835 A2

Aptamers to the Human IL-12 Cytokine Family and Their Use as Autoimmune Disease Therapeutics

FIELD OF INVENTION

[0001] The invention relates generally to the field of nucleic acids and more particularly to aptamers capable of binding to members of the human interleukin-12 (IL-12) cytokine family, more specifically to human interleukin-12 (IL-12), human interleukin-23 (IL-23), or both IL-12 and IL-23, and to other related cytokines (e.g., IL-27 and p40 dimer). Such aptamers are useful as therapeutics in and diagnostics of autoimmune related diseases and/or other diseases or disorders in which the IL-12 family of cytokines, specifically IL-23 and IL-12, have been implicated. The invention further relates to materials and methods for the administration of aptamers capable of binding to IL-23 and/or IL-12.

BACKGROUND OF THE INVENTION

[0002] Aptamers are nucleic acid molecules having specific binding affinity to molecules through interactions other than classic Watson-Crick base pairing.

[0003] Aptamers, like peptides generated by phage display or monoclonal antibodies ("mAbs"), are capable of specifically binding to selected targets and modulating the target's activity, *e.g.*, through binding aptamers may block their target's ability to function. Created by an *in vitro* selection process from pools of random sequence oligonucleotides, aptamers have been generated for over 100 proteins including growth factors, transcription factors, enzymes, immunoglobulins, and receptors. A typical aptamer is 10-15 kDa in size (30-45 nucleotides), binds its target with sub-nanomolar affinity, and discriminates against closely related targets (*e.g.*, aptamers will typically not bind other proteins from the same gene family). A series of structural studies have shown that aptamers are capable of using the same types of binding interactions (*e.g.*, hydrogen bonding, electrostatic complementarities, hydrophobic contacts, steric exclusion) that drive affinity and specificity in antibody-antigen complexes.

[0004] Aptamers have a number of desirable characteristics for use as therapeutics and diagnostics including high specificity and affinity, biological efficacy, and excellent

pharmacokinetic properties. In addition, they offer specific competitive advantages over antibodies and other protein biologics, for example:

[0005] 1) Speed and control. Aptamers are produced by an entirely *in vitro* process, allowing for the rapid generation of initial leads, including therapeutic leads. *In vitro* selection allows the specificity and affinity of the aptamer to be tightly controlled and allows the generation of leads, including leads against both toxic and non-immunogenic targets.

[0006] 2) Toxicity and Immunogenicity. Aptamers as a class have demonstrated little or no toxicity or immunogenicity. In chronic dosing of rats or woodchucks with high levels of aptamer (10 mg/kg daily for 90 days), no toxicity is observed by any clinical, cellular, or biochemical measure. Whereas the efficacy of many monoclonal antibodies can be severely limited by immune response to antibodies themselves, it is extremely difficult to elicit antibodies to aptamers most likely because aptamers cannot be presented by T-cells via the MHC and the immune response is generally trained not to recognize nucleic acid fragments.

[0007] 3) Administration. Whereas most currently approved antibody therapeutics are administered by intravenous infusion (typically over 2-4 hours), aptamers can be administered by subcutaneous injection (aptamer bioavailability via subcutaneous administration is >80% in monkey studies (Tucker *et al.*, J. Chromatography B. 732: 203-212, 1999)). This difference is primarily due to the comparatively low solubility and thus large volumes necessary for most therapeutic mAbs. With good solubility (>150 mg/mL) and comparatively low molecular weight (aptamer: 10-50 kDa; antibody: 150 kDa), a weekly dose of aptamer may be delivered by injection in a volume of less than 0.5 mL. In addition, the small size of aptamers allows them to penetrate into areas of conformational constrictions that do not allow for antibodies or antibody fragments to penetrate, presenting yet another advantage of aptamer-based therapeutics or prophylaxis.

[0008] 4) Scalability and cost. Therapeutic aptamers are chemically synthesized and consequently can be readily scaled as needed to meet production demand. Whereas difficulties in scaling production are currently limiting the availability of some biologics and the capital cost of a large-scale protein production plant is enormous, a single large-scale oligonucleotide synthesizer can produce upwards of 100 kg/year and requires a relatively modest initial investment. The current cost of goods for aptamer synthesis at the kilogram scale is estimated at $500/g, comparable to that for highly optimized antibodies. Continuing

improvements in process development are expected to lower the cost of goods to < $100/g in five years.

[0009] 5) Stability. Therapeutic aptamers are chemically robust. They are intrinsically adapted to regain activity following exposure to factors such as heat and denaturants and can be stored for extended periods (>1 yr) at room temperature as lyophilized powders.

CYTOKINES AND THE IMMUNE RESPONSE

[0010] The immune response in mammals is based on a series of complex cellular interactions called the "immune network." In addition to the network-like cellular interactions of lymphocytes, macrophages, granulocytes, and other cells, soluble proteins known as lymphokines, cytokines, or monokines play a critical role in controlling these cellular interactions. Cytokine expression by cells of the immune system plays an important role in the regulation of the immune response. Most cytokines are pleiotropic and have multiple biological activities including antigen-presentation; activation, proliferation, and differentiation of CD4+ cell subsets; antibody response by B cells; and manifestations of hypersensitivity. Cytokines are implicated in a wide range of degenerative or abnormal conditions which directly or indirectly involve the immune system and/or hematopoietic cells. An important family of cytokines is the IL-12 family which includes, *e.g.*, IL-12, IL-23, IL-27, and p40 monomers and p40 dimers.

[0011] IL-23 is a covalently linked heterodimeric molecule composed of the p19 and p40 subunits, each encoded by separate genes. IL-12 is also a covalently linked heterodimeric molecule and consists of the p35 and p40 subunits. Thus, IL-23 and IL-12 both have the p40 subunit in common (Figure 1). Human and mouse p19 share ~70% amino acid sequence identity and are closely related to p35 (the subunit unique to IL-12). Transfection assays reveal that like p35, p19 protein is poorly secreted when expressed alone and requires the co-expression of its heterodimerizing partner p40 for higher expression. Together, p40 and p19 form a disulfide-linked heterodimer. The p19 component is produced in large amounts by activated macrophages, dendritic cells ("DCs"), endothelial cells, and T cells. Th1 cells express larger amounts of p19 mRNA than do Th2 cells; however, among these cell types only activated macrophages and DCs constitutively express p40, the other component of IL-23. The expression of p19 is increased by bacterial products that signal through the Toll-like receptor-2, which suggests that p19, and thus IL-23, may function in the immune response to certain bacterial infections.

[0012] One of the shared actions of IL-12 and IL-23 is their proliferative effect on T-cells (Brombacher *et al.*, Trends in Immun. (2003)). However, clear differences exist in the T-cell subsets on which these cytokines act. In the mouse, IL-12 induces proliferation of naïve murine T cells but not memory T cells, whereas the proliferative effect of IL-23 is confined to memory T cells. In humans, IL-12 promotes proliferation of both naïve and memory human T-cells; however, the proliferative effect of IL-23 is still restricted to memory T cells. Also, the action of IL-23 on IFN-γ production is directed primarily toward memory T cells in humans. Although IL-12 can induce IFN-γ production in naïve T-cells and, to a greater extent, memory T-cells, IL-23 has very little effect on IFN-γ production in naïve T-cells. A moderate increase in IFN-γ production is observed in memory T-cells stimulated by IL-23, but this effect is somewhat smaller than that resulting from stimulation with IL-12.

[0013] Thus, IL-23 has biological activity that is distinct from IL-12, however both are believed to play a role in autoimmune and inflammatory diseases such as multiple sclerosis, rheumatoid arthritis, psoriasis, systemic lupus erythematosus, and irritable bowel diseases (including Crohn's disease and ulcerative colitis), in addition to diseases such as bone resoprtion in osteoporosis, Type I Diabetes, and cancer.

IL-23 AND/OR IL-12 SPECIFIC APTAMERS AS AUTOIMMUNE DISEASE THERAPEUTICS

[0014] While not intending to be bound by theory, it is believed that IL-12 and IL-23 are involved in multiple sclerosis ("MS") pathogenesis. For example, p40 levels are up-regulated in the cerebral spinal fluid of MS patients (Fassbender *et al.*, (1998) Neurology 51:753). In addition, an anti-p40 mAb has been shown to localize to lesions in the brain (Brok *et al.*, JI (2002)169:6554). Furthermore, lower baseline levels of p40 mRNA have been shown to predict clinical responsiveness to IFN-β treatment (Van-Boxel-Dezaire *et al.*, 1999). Thus, a knock-down of both IL-12 and IL-23 via p40 might ameliorate the symptoms of MS. In fact, anti-p40 antibodies have been shown to significantly suppress the development and severity of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis ("EAE") in mice (Constantinescu *et al.*, JI (1998) 161:5097) and in marmosets (Brok *et al.*, JI (2002)169:6554).

[0015] Despite the evidence showing that knocking out both IL-23 and IL-12 suppresses the development and symptoms of MS, there is strong evidence that IL-23 is the more

important of the two in MS/EAE pathogenesis in mice, as shown by the effects of IL-12 and IL-23 knock-outs on the EAE mouse model. (Cua *et al.*, (2003) Nature 421:744). For example, EAE can occur in p35 knockout mice, but not p19 or p40 knock-out mice (Cua *et al.*, (2003). Expression of IL-23 but not IL-12 in the CNS rescues EAE in p19/p40 knock-out mice, although over-expression of IL-12 exacerbates EAE, so IL-12 seems to play some role in general TH1 cell development and activation (Cua *et al.*). In humans, over-expression of p40 mRNA but not p35 mRNA has been observed in the Central Nervous System (CNS) of MS patients.

[0016] In addition to playing a general role in activating Th1 cells, IL-12 may be more important for fighting infection than IL-23. In mice, a p19 knock-out induces classic Th1 cell response (high IFN-gamma, low IL-4), whereas the response in p35 and p40 knock-out mice is restricted to Th2 cells (low IFN-gamma, high IL-4) (Cua *et al.*). Additionally, p19 knock-out immune cells produce strong pro-inflammatory cytokines, whereas p40 knock-out immune cells cannot. Lastly, p40, IL-12Rβ1 and IL-12Rβ2 knock-out mice are susceptible to a variety of infections (Adorini, from Contemporary Immunology (2003) pg. 253). Thus inhibiting IL-23 specifically through aptamer therapeutics may effectively fight IL-23 mediated disease while leaving the patient more able to fight infection.

[0017] Both IL-23 and/or IL-12 have been implicated in rheumatoid arthritis as a promoter of end-stage joint inflammation. While not intending to be bound by theory, it is believed that IL-23 affects the function of memory T-cells and inflammatory macrophages through engagement of the IL-23 receptor (IL-23R) on these cells. Studies indicate the IL-23 subunits p19 and/or p40 play a role in murine collagen-induced arthritis ("CIA"), the mouse model for rheumatoid arthritis. Anti-p40 antibodies have been shown to ameliorate the symptoms in murine CIA and prevent development and progression alone and when combined with anti-tumor necrosis factor (anti-TNF) treatment (Malfait *et al.*, Clin. Exp. Immunol. (1998) 111:377, Matthys *et al.*, Eur. J. Immunol. (1998) 28:2143, and Butler *et al.*, Eur. J. Immunol. (1999) 29:2205). Furthermore, p19 and p40 knockout mice have been shown to be completely resistant to the development of CIA while CIA development and severity is exacerbated in p35 knock-out mice (McIntyre *et al.*, Eur. J. Immunol. (1996) 26:2933, and Murphy *et al.*, J. Exp. Med. (2003) 198:1951). Thus, the aptamers and methods of the present invention that bind to and inhibit IL-23 are useful as therapeutic agents for rheumatoid arthritis.

[0018] Both IL-23 and/or IL-12 are also believed to play a dominant role in the recruitment of inflammatory cells in Th-1 mediated diseases such as psoriasis vulgaris, and irritable bowel disease, including but not limited to Crohn's disease and ulcerative colitis. For example, elevated levels of p19 and p40 mRNA were detected by quantitative RT-PCR in skin lesions of patients with psoriasis vulgaris, whereas p35 mRNA was not (Lee *et al.*, J Exp Med (2004) 199(1):125-30). In 2, 4, 6, trinitrobenzene sulfonic acid ("TNBS") colitis, an experimental model of inflammatory bowel disease in mice, treatment with an anti-IL-12 monoclonal antibody proved efficacious in completely ameliorating/preventing mucosal inflammation (Neurath *et al.*, J Exp Med (1995) 182:1281-1290). In another study which evaluated several different IL-12 antagonists in the TNBS colitis model, an anti-IL-12 p40 antibody proved to be the most effective in preventing mucosal inflammation, thus implicating both IL-12 and IL-23 (Schmidt *et al.*, Pathobiology (2002-03); 70:177-183). Thus, the aptamers of the present invention that bind to and inhibit IL-12 and/or IL-23 are useful as therapeutic agents for psoriasis and inflammatory bowel diseases.

[0019] It is also believed that IL-12 and/or IL-23 play a role in systemic lupus erythamatosus ("SLE"). For example, serum obtained from SLE patients were found to contain significantly higher amounts of p40 as a monomer than serum levels of p40 as a heterodimer e.g., IL-12 (p35/p40) and IL-23 (p19/p40), indicating that deficient IL-23 and/or IL-12 production may play a role in the pathogenesis of SLE. Thus, aptamers of the invention which enhance the biological function of IL-23 and/or IL-12 are useful as therapeutics in the treatment of systemic lupus erythamatosus (Lauwerys *et al.*, Lupus (2002) 11(6):384-7).

IL-23 AND/OR IL-12 SPECIFIC APTAMERS AS ONCOLOGICAL THERAPEUTICS

[0020] The anti-tumor activity of IL-12 has been well characterized, and recent studies have shown that IL-23 also possesses anti-tumor and anti-metastatic activity. For example, colon carcinoma cells retrovirally transduced with IL-23 significantly reduced the growth of colon tumors established by the cell line in immunocompetent mice as compared to a control cell line, indicating that the expression of IL-23 in tumors produces an anti-tumor effect. (Wang *et al.*, Int. J. Cancer: 105, 820-824 (2003). Likewise, a lung carcinoma cell line retrovirally engineered to release single chain IL-23 ("scIL-23") significantly suppressed lung metastases in BALB/c mice, resulting in almost complete tumor rejection (Lo *et al.*, J. Immmnol 2003, 171:600-607). Thus, aptamers that bind to IL-23 and/or IL-12 and enhance

their biological function are useful as oncological therapeutics for the treatment of colon cancer, lung cancer, specifically lung metastases, and other oncological diseases for which IL-23 and/or IL-12 have an anti-tumor effect.

[0021] There is currently no known therapeutic agent that specifically targets human IL-23. Available agents that target IL-23 include an anti-human IL-23 p19 polyclonal antibody available through R&D Systems (Minneapolis, MN) for research use only, an anti-human p40 monoclonal antibody which targets both IL-12 and IL-23, since both cytokines have the p40 subunit in common, and anti-mouse IL-23 p19 polyclonal and monoclonal antibodies, which target mouse IL-23, not human IL-23 (Pirhonen, *et al.*, (2002), J Immunology 169:5673-5678). As previously explained, an agent that inhibits the activity of both IL-23 and IL-12 may leave patients more vulnerable to infections, and generally can pose more complications in terms of developing a therapeutic agent than an agent that inhibits only IL-23. Since there is evidence that IL-23 plays a more important role than IL-12 for autoimmune inflammation in the brain and joints, a therapeutic specific for only IL-23 may be more advantageous than an agent which targets both cytokines, such as the anti-p40 human mAb.

[0022] Given the advantages of specificity, small size, and affinity of aptamers as therapeutic agents, it would be beneficial to have materials and methods for aptamer therapeutics to treat diseases in which human cytokines, specifically IL-23 and IL-12, play a role in pathogenesis. The present invention provides materials and methods to meet these and other needs.

SUMMARY OF THE INVENTION

[0023] The present invention provides materials and methods for the treatment of autoimmune and inflammatory disease and other related diseases/disorders in which IL-23 and/or IL-12 are involved in pathogenesis.

[0024] In one embodiment, the materials of the present invention provide aptamers that specifically bind to IL-23. In one embodiment, IL-23 to which the aptamers of the invention bind is human IL-23 while in another embodiment IL-23 is a variant of human IL-23. In one embodiment the variant of IL-23 performs a biological function that is essentially the same as a function of human IL-23 and has substantially the same structure and substantially the same ability to bind said aptamer as that of human IL-23.

[0025] In one embodiment, human IL-23 or a variant thereof comprises an amino acid sequence which is at least 70% identical, preferably at least 80% identical, more preferably at least 90% identical to a sequence comprising SEQ ID NOs 4 and/or 5. In another embodiment, human IL-23 or a variant thereof has an amino acid sequence comprising SEQ ID NOs 4 and 5.

[0026] In one embodiment, the aptamer of the invention has a dissociation constant for human IL-23 or a variant thereof of about 100 nM or less, preferably 50 nM or less, more preferably 10 nM or less, even more preferably 1 nM or less.

[0027] In one embodiment, the aptamer of the present invention modulates a function of human IL-23 or a variant thereof. In one embodiment, the aptamer of the present invention stimulates a function of human IL-23. In another embodiment, the aptamer of the present invention inhibits a function of human IL-23 or a variant thereof. In yet another embodiment, the aptamer of the present invention inhibits a function of human IL-23 or a variant thereof *in vivo*. In yet another embodiment, the aptamer of the present invention prevents IL-23 from binding to the IL-23 receptor. In some embodiments, the function of human IL-23 or a variant thereof which is modulated by the aptamer of the invention is to mediate a disease associated with human IL-23 such as: autoimmune disease (including but not limited to multiple sclerosis, rheumatoid arthritis, psoriasis, systemic lupus erythamatosus, and irritable bowel disease (e.g., Crohn's Disease and ulcerative colitis)), inflammatory disease, cancer (including but not limited to colon cancer, lung cancer, and lung metastases), bone resorption in osteoporosis, and Type I Diabetes.

[0028] In one embodiment, the aptamer of the invention has substantially the same ability to bind human IL-23 as that of an aptamer comprising a nucleotide sequence selected from the group consisting of: SEQ ID NOs 13-66, SEQ ID NOs 71-88, SEQ ID NOs 91-96, SEQ ID NOs 103-118, SEQ ID NOs 124-130, SEQ ID NOs 135-159, SEQ ID NO 162, and SEQ ID NOs 164-172, SEQ ID NOs 176-178, SEQ ID NOs 181-196, and SEQ ID NOs 203-314. In another embodiment the aptamer of the invention has substantially the same structure and substantially the same ability to bind IL-23 as that of an aptamer comprising a nucleotide sequence selected from the group consisting of: SEQ ID NOs 13-66, SEQ ID NOs 71-88, SEQ ID NOs 91-96, SEQ ID NOs 103-118, SEQ ID NOs 124-130, SEQ ID NOs 135-159, SEQ ID NO 162, and SEQ ID NOs 164-172, SEQ ID NOs 176-178, SEQ ID NOs 181-196, and SEQ ID NOs 203-314.

[0029] In one embodiment, the present invention provides an aptamer that binds to human IL-23 comprising a nucleic acid sequence at least 80% identical, more preferably at least 90% identical to any one of the sequences selected from the group consisting of: SEQ ID NOs 13-66, SEQ ID NOs 71-88, SEQ ID NOs 91-96, SEQ ID NOs 103-118, SEQ ID NOs 124-130, SEQ ID NOs 135-159, SEQ ID NO 162, and SEQ ID NOs 164-172, SEQ ID NOs 176-178, SEQ ID NOs 181-196, and SEQ ID NOs 203-314. In another embodiment, the present invention provides an aptamer comprising 4 contiguous nucleotides, preferably 8 contiguous nucleotides, more preferably 20 contiguous nucleotides that are identical to a sequence of 4, 8, or 20 contiguous nucleotides in the unique sequence region of any one of the sequences selected from the group of: SEQ ID NOs 13-66, SEQ ID NOs 71-88, SEQ ID NOs 91-96, SEQ ID NOs 103-118, SEQ ID NOs 124-130, SEQ ID NOs 135-159, SEQ ID NO 162, and SEQ ID NOs 164-172, SEQ ID NOs 176-178, SEQ ID NOs 181-196, and SEQ ID NOs 203-314. In yet another embodiment the present invention provides an aptamer capable of binding human IL-23 or a variant thereof comprising a nucleotide sequence selected from the group consisting of: SEQ ID NOs 13-66, SEQ ID NOs 71-88, SEQ ID NOs 91-96, SEQ ID NOs 103-118, SEQ ID NOs 124-130, SEQ ID NOs 135-159, SEQ ID NO 162, and SEQ ID NOs 164-172, SEQ ID NOs 176-178, SEQ ID NOs 181-196, and SEQ ID NOs 203-314. In another embodiment, the present invention provides an aptamer having the sequence set forth in SEQ ID NO 177, preferably SEQ ID NO 224, more preferably SEQ ID NO 309, more preferably SEQ ID NO 310, and more preferably SEQ ID NO 311.

[0030] In one embodiment, the present invention provides aptamers that specifically bind to mouse IL-23. In another embodiment, the present invention provides aptamers that bind to a variant of mouse IL-23 that performs a biological function that is essentially the same as a function of mouse IL-23 and has substantially the same structure and substantially the same ability to bind said aptamer as that of mouse IL-23.

[0031] In one embodiment, mouse IL-23 or a variant thereof to which the aptamer of the invention binds comprises an amino acid sequence which is at least 80%, preferably at least 90% identical to a sequence comprising SEQ ID NOs 315 and/or 316. In another embodiment mouse IL-23 or a variant thereof has an amino acid sequence comprising SEQ ID NOs 315 and 316.

[0032] In one embodiment, the aptamer of the invention has a dissociation constant for mouse IL-23 or a variant thereof of about 100 nM or less, preferably 50 nM or less, more preferably 10 nM or less.

[0033] In one embodiment, the aptamer of the invention modulates a function of mouse IL-23 or a variant thereof. In one embodiment, the aptamer of the invention stimulates a function of mouse IL-23. In another embodiment, the aptamer of the invention inhibits a function of mouse IL-23 or a variant thereof. In yet another embodiment, the aptamer of the invention inhibits a function of mouse IL-23 or a variant thereof *in vivo*. In yet another embodiment, the aptamer of the invention prevents the binding of mouse IL-23 to the mouse IL-23 receptor. In some embodiments, the function of mouse IL-23 which is modulated by the aptamer of the present invention is to mediate a disease model associated with mouse IL-23 such as experimental autoimmune encephalomyelitis, murine collagen-induced arthritis, and TNBS colitis.

[0034] In one embodiment, the aptamer of the invention has substantially the same ability to bind mouse IL-23 as that of an aptamer comprising a nucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs 124-134 and SEQ ID NOs 199-202. In another embodiment, the aptamer of the invention has substantially the same structure and substantially the same ability to bind mouse IL-23 as that of an aptamer comprising a nucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs 124-134 and SEQ ID NOs 199-202.

[0035] In one embodiment, the present invention provides aptamers that bind to mouse IL-23 comprising a nucleic acid sequence at least 80% identical, preferably at least 90% identical to any one of the sequences selected from the group consisting of SEQ ID NOs 124-134, and SEQ ID NOs 199-202. In another embodiment, the present invention provides aptamers comprising 4 contiguous, preferably 8 contiguous, more preferably 20 contiguous nucleotides that are identical to a sequence of 4, 8 or 20 contiguous nucleotides in the unique sequence region of any one of the sequences selected from the group consisting of: SEQ ID NOs 124-134 and SEQ ID NOs 199-202. In another embodiment, the present invention provides an aptamer capable of binding mouse IL-23 or a variant thereof comprising a nucleotide sequence selected from the group consisting of: SEQ ID NOs 124-134 and SEQ ID NOs 199-202.

[0036] In one embodiment, the materials of the present invention provide aptamers that specifically bind to IL-12. In one embodiment, IL-12 to which the aptamers of the invention bind is human IL-12 while in another embodiment IL-12 is a variant of human IL-12. In one embodiment the variant of IL-12 performs a biological function that is essentially the same as a function of human IL-12 and has substantially the same structure and substantially the same ability to bind said aptamer as that of human IL-12.

[0037] In one embodiment, human IL-12 or a variant thereof comprises an amino acid sequence which is at least 80% identical, preferably at least 90% identical to a sequence comprising SEQ ID NOs 4 and/or 6. In another embodiment, human IL-12 or a variant thereof has an amino acid sequence comprising SEQ ID NOs 4 and 6.

[0038] In one embodiment, the aptamer of the present invention modulates a function of human IL-12 or a variant thereof. In one embodiment, the aptamer of the present invention stimulates a function of human IL-23. In another embodiment, the aptamer of the present invention inhibits a function of human IL-12 or a variant thereof. In yet another embodiment, the aptamer of the present invention inhibits a function of human IL-12 or a variant thereof *in vivo*. In yet another embodiment, the aptamer of the present invention prevents IL-12 from binding to the IL-12 receptor. In one embodiment, the function of human IL-12 or a variant thereof which is modulated by the aptamer of the invention is to mediate a disease associated with human IL-12 such as: autoimmune disease (including but not limited to multiple sclerosis, rheumatoid arthritis, psoriasis, systemic lupus erythamatosus, and irritable bowel disease (e.g., Crohn's Disease and ulcerative colitis)), inflammatory disease, cancer (including but not limited to colon cancer, lung cancer, and lung metastases), bone resorption in osteoporosis, and Type I Diabetes.

[0039] In one embodiment, the present invention provides aptamers which are either ribonucleic or deoxyribonucleic acid. In a further embodiment, these ribonucleic or deoxyribonucleic acid aptamers are single stranded. In another embodiment, the present invention provides aptamers comprising at least one chemical modification. In one embodiment, the modification is selected from the group consisting of: a chemical substitution at a sugar position; a chemical substitution at a phosphate position; and a chemical substitution at a base position, of the nucleic acid; incorporation of a modified nucleotide; 3' capping; conjugation to a high molecular weight, non-immunogenic compound; conjugation to a lipophilic compound; and phosphate backbone modification. In

one embodiment, the non-immunogenic, high molecular weight compound conjugated to the aptamer of the invention is polyalkylene glycol, preferably polyethylene glycol. In one embodiment, the backbone modification comprises incorporation of one or more phosphorothioates into the phosphate backbone. In another embodiment, the aptamer of the invention comprises the incorporation of fewer than 10, fewer than 6, or fewer than 3 phosphorothioates in the phosphate backbone.

[0040] In one embodiment, the materials of the present invention provide a pharmaceutical composition comprising a therapeutically effective amount of an aptamer comprising a nucleic acid sequence selected from the group consisting of: SEQ ID NOs 13-66, SEQ ID NOs 71-88, SEQ ID NOs 91-96, SEQ ID NOs 103-118, SEQ ID NOs 124-130, SEQ ID NOs 135-159, SEQ ID NO 162, and SEQ ID NOs 164-172, SEQ ID NOs 176-178, SEQ ID NOs 181-196, and SEQ ID NOs 203-314, or a salt thereof, and a pharmaceutically acceptable carrier or diluent. In another embodiment, the materials of the present invention provide a pharmaceutical composition comprising a therapeutically effective amount of an aptamer comprising a nucleic acid sequence selected from the group consisting of: SEQ ID NO 14, SEQ ID NOs 17-19, SEQ ID NO 21, SEQ ID NOs 27-32, SEQ ID NOs 34-40, SEQ ID NO 42, SEQ ID NO 49, SEQ ID NOs 60-61, SEQ ID NOs 91-92, SEQ ID NO 94, and SEQ ID NOs 103-118, or a salt thereof, and a pharmaceutically acceptable carrier or diluent. In a preferred embodiment, the materials of the present invention provide a pharmaceutical composition comprising a therapeutically effective amount of an aptamer comprising a nucleic acid sequence selected from the group consisting of: SEQ ID NO 177, SEQ ID NO 224, and SEQ ID NOs 309-312.

[0041] In one embodiment, the present invention provides a method of treating, preventing or ameliorating a disease mediated by IL-23, comprising administering the composition comprising a therapeutically effective amount of an aptamer comprising a nucleic acid sequence selected from the group consisting of: SEQ ID NOs 13-66, SEQ ID NOs 71-88, SEQ ID NOs 91-96, SEQ ID NOs 103-118, SEQ ID NOs 124-130, SEQ ID NOs 135-159, SEQ ID NO 162, and SEQ ID NOs 164-172, SEQ ID NOs 176-178, SEQ ID NOs 181-196, and SEQ ID NOs 203-314, to a vertebrate. In another embodiment, the present invention provides a method of treating, preventing or ameliorating a disease mediated by IL-23 and/or IL-12, comprising administering the composition comprising a therapeutically effective amount of an aptamer comprising a nucleic acid sequence selected from the group

consisting of: SEQ ID NO 14, SEQ ID NOs 17-19, SEQ ID NO 21, SEQ ID NOs 27-32, SEQ ID NOs 34-40, SEQ ID NO 42, SEQ ID NO 49, SEQ ID NOs 60-61, SEQ ID NOs 91-92, SEQ ID NO 94, and SEQ ID NOs 103-118, to a vertebrate. In a preferred embodiment the composition comprising a therapeutically effective amount of an aptamer administered to a vertebrate comprises a nucleic acid sequence selected from the group consisting of: SEQ ID NO 177, SEQ ID NO 224, and SEQ ID NOs 309-312. In one embodiment the vertebrate to which the pharmaceutical composition is administered is a mammal. In a preferred embodiment, the mammal is a human.

[0042] In one embodiment, the disease treated, prevented or ameliorated by the methods of the present invention is selected from the group consisting of: autoimmune disease (including but not limited to multiple sclerosis, rheumatoid arthritis, psoriasis, systemic lupus erythamatosus, and irritable bowel disease (*e.g.*, Crohn's Disease and ulcerative colitis)), inflammatory disease, cancer (including but not limited to colon cancer, lung cancer, and lung metastases), bone resorption in osteoporosis, and Type I Diabetes.

[0043] In one embodiment, the present invention provides a diagnostic method comprising contacting an aptamer with a nucleic acid sequence selected from the group consisting of: SEQ ID NOs 13-66, SEQ ID NOs 71-88, SEQ ID NOs 91-96, SEQ ID NOs 103-118, SEQ ID NOs 124-134, SEQ ID NOs 135-159, SEQ ID NO 162, and SEQ ID NOs 164-172, SEQ ID NOs 176-178, SEQ ID NOs 181-196, and SEQ ID NOs 199-314 with a composition suspected of comprising IL-23 and/or IL-12 or a variant thereof, and detecting the presence or absence of IL-23 and/or IL-12 or a variant thereof.

[0044] In one embodiment, the present invention provides an aptamer with a nucleic acid sequence selected from the group consisting of: SEQ ID NOs 13-66, SEQ ID NOs 71-88, SEQ ID NOs 91-96, SEQ ID NOs 103-118, SEQ ID NOs 124-134, SEQ ID NOs 135-159, SEQ ID NO 162, and SEQ ID NOs 164-172, SEQ ID NOs 176-178, SEQ ID NOs 181-196, and SEQ ID NOs 199-314 for use as an *in vitro* diagnostic. In another embodiment, the present invention provides an aptamer with a nucleic acid sequence selected from the group consisting of: SEQ ID NOs 13-66, SEQ ID NOs 71-88, SEQ ID NOs 91-96, SEQ ID NOs 103-118, SEQ ID NOs 124-134, SEQ ID NOs 135-159, SEQ ID NO 162, and SEQ ID NOs 164-172, SEQ ID NOs 176-178, SEQ ID NOs 181-196, and SEQ ID NOs 199-314 for use as an *in vivo* diagnostic. In yet another embodiment, the present invention provides an aptamer with a nucleic acid sequence selected from the group consisting of: SEQ ID NOs 13-66, SEQ

ID NOs 71-88, SEQ ID NOs 91-96, SEQ ID NOs 103-118, SEQ ID NOs 124-134, SEQ ID NOs 135-159, SEQ ID NO 162, and SEQ ID NOs 164-172, SEQ ID NOs 176-178, SEQ ID NOs 181-196, and SEQ ID NOs 199-314 for use in the treatment, prevention or amelioration of disease *in vivo*.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

[0045] Figure 1 is a schematic representation of the Interleukin-12 family of cytokines.

[0046] Figure 2 is a schematic representation of the *in vitro* aptamer selection (SELEX™) process from pools of random sequence oligonucleotides.

[0047] Figure 3 is a schematic of the *in vitro* selection scheme for selecting aptamers specific to IL-23 by including IL-12 in the negative selection step thereby eliminating sequences that recognize p40, the common subunit in both IL-12 and IL-23.

[0048] Figure 4 is an illustration of a 40 kDa branched PEG.

[0049] Figure 5 is an illustration of a 40 kDa branched PEG attached to the 5'end of an aptamer.

[0050] Figure 6 is an illustration depicting various PEGylation strategies representing standard mono-PEGylation, multiple PEGylation, and dimerization via PEGylation.

[0051] Figure 7 is a graph showing binding of rRmY and rGmH pools to IL-23 after various rounds of selection.

[0052] Figure 8A is a representative schematic of the sequence and predicted secondary structure configuration of a Type 1 IL-23 aptamers; Figure 8B is a representative schematic of the sequences and predicted secondary structure configuration of several Type 2 IL-23 aptamers.

[0053] Figure 9A is a schematic of the minimized aptamer sequences and predicted secondary structure configurations for Type 1 IL-23 aptamers; Figure 9B is a schematic of the minimized aptamer sequences and predicted secondary structure configurations for Type 2 IL-23 aptamers.

[0054] Figure 10 depicts the predicted G-Quartet structure for dRmY minimer ARC979 (SEQ ID NO 177).

[0055] Figure 11 is a graph showing an increase of NMM fluorescence in ARC979 (SEQ ID NO 177), confirming that ARC979 adopts a G-quartet structure.

[0056] Figure 12 is a graph of the ARC979 (SEQ ID NO 177) competition binding curve analyzed based on total [aptamer] bound using 50 nM IL-23.

[0057] Figure 13 is a graph of the ARC979 (SEQ ID NO 177) competition binding curve analyzed based on [aptamer] bound using 250 nM IL-12.

[0058] Figure 14 is a graph of the direct binding curves for ARC979 (SEQ ID NO 177) under two different binding reaction conditions (1X PBS (without Ca^{++} or Mg^{++}) or 1X Dulbeccos PBS (with Ca^{++} and Mg^{++}).

[0059] Figure 15 is a graph of the direct binding curves for ARC979 (SEQ ID NO 177) phosphorothioate derivatives depicting that single phosphorothioate substitutions yield increased proportion binding to IL-23.

[0060] Figure 16 is a graph of the competition binding curves for ARC979 (SEQ ID NO 177) phosphorothioate derivatives depicting that single phosphorothioate substitutions compete for IL-23 at a higher affinity that ARC979.

[0061] Figure 17 is a graph of the direct binding curves for the ARC979 optimized derivatives ARC1624 (SEQ ID NO 310) and ARC1625 (SEQ ID NO 311), compared to the parent ARC979 (SEQ ID NO 177) aptamer (ARC895 is a negative control).

[0062] Figure 18 is a graph depicting the plasma stability of ARC979 (SEQ ID NO 177) compared to optimized ARC979 derivative constructs.

[0063] Figure 19 is a schematic representation of the TransAM™ assay used to measure STAT3 activity in lysates of PHA blast cells exposed to aptamers of the invention.

[0064] Figure 20 is a flow diagram of the protocol used for the detection of IL-23 induced STAT3 phosphorylation in PHA blasts exposed to aptamers of the invention.

[0065] Figure 21 is a representative graph showing the inhibitory effect of parental IL-23 aptamers of rRfY composition compared to their respective optimized clones on IL-23 induced STAT3 phosphorylation in PHA Blasts using the TransAM™ Assay.

[0066] Figure 22 is a graph of the percent inhibition of IL-23 induced STAT3 phosphorylation by IL-23 aptamers of dRmY composition in the TransAM™ assay (ARC793 (SEQ ID NO 163) is a non-binding aptamer).

[0067] Figure 23 is a graph of the percent inhibition of IL-23 induced STAT3 phosphorylation by parental IL-23 aptamers of dRmY composition (ARC621 (SEQ ID NO 108), ARC627 (SEQ ID NO 110)) compared to their respective optimized clones (ARC979 (SEQ ID NO 177), ARC980 (SEQ ID NO 178), ARC982 (SEQ ID NO 180)) in the TransAM™ assay.

[0068] Figure 24 is a percent inhibition graph of IL-23 induced STAT 3 phosphorylation by ARC979 (SEQ ID NO 177) and two optimized derivative clones of ARC979 (ARC1624 (SEQ ID NO 310) and ARC1625 (SEQ ID NO311)) in the Pathscan® assay.

[0069] Figure 25 is a graph comparing human and mouse IL-23 induced STAT3 activation in human PHA Blasts, measured by the TransAM™ assay.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

[0070] The details of one or more embodiments of the invention are set forth in the accompanying description below. Although any methods and materials similar or equivalent to those described herein can be used in the practice or testing of the present invention, the preferred methods and materials are now described. Other features, objects, and advantages of the invention will be apparent from the description. In the specification, the singular forms also include the plural unless the context clearly dictates otherwise. Unless defined otherwise, all technical and scientific terms used herein have the same meaning as commonly understood by one of ordinary skill in the art to which this invention belongs. In the case of conflict, the present Specification will control.

THE SELEX™ METHOD

[0071] A suitable method for generating an aptamer is with the process entitled "Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment" ("SELEX™") generally depicted in Figure 2. The SELEX™ process is a method for the *in vitro* evolution of nucleic acid molecules with highly specific binding to target molecules and is described in, e.g., U.S. patent application Ser. No. 07/536,428, filed Jun. 11, 1990, now abandoned, U.S. Pat. No. 5,475,096 entitled "Nucleic Acid Ligands", and U.S. Pat. No. 5,270,163 (see also WO 91/19813) entitled "Nucleic Acid Ligands". Each SELEX™-identified nucleic acid ligand, *i.e.*, each aptamer, is a specific ligand of a given target compound or molecule. The SELEX™ process is based on the unique insight that nucleic acids have sufficient capacity for forming

a variety of two- and three-dimensional structures and sufficient chemical versatility available within their monomers to act as ligands (*i.e.*, form specific binding pairs) with virtually any chemical compound, whether monomeric or polymeric. Molecules of any size or composition can serve as targets.

[0072] SELEX™ relies as a starting point upon a large library or pool of single stranded oligonucleotides comprising randomized sequences. The oligonucleotides can be modified or unmodified DNA, RNA, or DNA/RNA hybrids. In some examples, the pool comprises 100% random or partially random oligonucleotides. In other examples, the pool comprises random or partially random oligonucleotides containing at least one fixed sequence and/or conserved sequence incorporated within randomized sequence. In other examples, the pool comprises random or partially random oligonucleotides containing at least one fixed sequence and/or conserved sequence at its 5' and/or 3' end which may comprise a sequence shared by all the molecules of the oligonucleotide pool. Fixed sequences are sequences common to oligonucleotides in the pool which are incorporated for a preselected purpose such as, CpG motifs described further below, hybridization sites for PCR primers, promoter sequences for RNA polymerases (e.g., T3, T4, T7, and SP6), restriction sites, or homopolymeric sequences, such as poly A or poly T tracts, catalytic cores, sites for selective binding to affinity columns, and other sequences to facilitate cloning and/or sequencing of an oligonucleotide of interest. Conserved sequences are sequences, other than the previously described fixed sequences, shared by a number of aptamers that bind to the same target.

[0073] The oligonucleotides of the pool preferably include a randomized sequence portion as well as fixed sequences necessary for efficient amplification. Typically the oligonucleotides of the starting pool contain fixed 5' and 3' terminal sequences which flank an internal region of 30–50 random nucleotides. The randomized nucleotides can be produced in a number of ways including chemical synthesis and size selection from randomly cleaved cellular nucleic acids. Sequence variation in test nucleic acids can also be introduced or increased by mutagenesis before or during the selection/amplification iterations.

[0074] The random sequence portion of the oligonucleotide can be of any length and can comprise ribonucleotides and/or deoxyribonucleotides and can include modified or non-natural nucleotides or nucleotide analogs. See, e.g., U.S. Patent No. 5,958,691; U.S. Patent No. 5,660,985; U.S. Patent No. 5,958,691; U.S. Patent No. 5,698,687; U.S. Patent No. 5,817,635; U.S. Patent No. 5,672,695, and PCT Publication WO 92/07065. Random

oligonucleotides can be synthesized from phosphodiester-linked nucleotides using solid phase oligonucleotide synthesis techniques well known in the art. See, e.g., Froehler *et al.*, Nucl. Acid Res. 14:5399-5467 (1986) and Froehler *et al.*, Tet. Lett. 27:5575-5578 (1986). Random oligonucleotides can also be synthesized using solution phase methods such as triester synthesis methods. See, e.g., Sood *et al.*, Nucl. Acid Res. 4:2557 (1977) and Hirose *et al.*, Tet. Lett., 28:2449 (1978). Typical syntheses carried out on automated DNA synthesis equipment yield 10^{14}-10^{16} individual molecules, a number sufficient for most SELEX™ experiments. Sufficiently large regions of random sequence in the sequence design increases the likelihood that each synthesized molecule is likely to represent a unique sequence.

[0075] The starting library of oligonucleotides may be generated by automated chemical synthesis on a DNA synthesizer. To synthesize randomized sequences, mixtures of all four nucleotides are added at each nucleotide addition step during the synthesis process, allowing for random incorporation of nucleotides. As stated above, in one embodiment, random oligonucleotides comprise entirely random sequences; however, in other embodiments, random oligonucleotides can comprise stretches of nonrandom or partially random sequences. Partially random sequences can be created by adding the four nucleotides in different molar ratios at each addition step.

[0076] The starting library of oligonucleotides may be either RNA or DNA. In those instances where an RNA library is to be used as the starting library it is typically generated by transcribing a DNA library *in vitro* using T7 RNA polymerase or modified T7 RNA polymerases and purified. The RNA or DNA library is then mixed with the target under conditions favorable for binding and subjected to step-wise iterations of binding, partitioning and amplification, using the same general selection scheme, to achieve virtually any desired criterion of binding affinity and selectivity. More specifically, starting with a mixture containing the starting pool of nucleic acids, the SELEX™ method includes steps of: (a) contacting the mixture with the target under conditions favorable for binding; (b) partitioning unbound nucleic acids from those nucleic acids which have bound specifically to target molecules; (c) dissociating the nucleic acid-target complexes; (d) amplifying the nucleic acids dissociated from the nucleic acid-target complexes to yield a ligand-enriched mixture of nucleic acids; and (e) reiterating the steps of binding, partitioning, dissociating and amplifying through as many cycles as desired to yield highly specific, high affinity nucleic acid ligands to the target molecule. In those instances where RNA aptamers are being

selected, the SELEX™ method further comprises the steps of: (i) reverse transcribing the nucleic acids dissociated from the nucleic acid-target complexes before amplification in step (d); and (ii) transcribing the amplified nucleic acids from step (d) before restarting the process.

[0077] Within a nucleic acid mixture containing a large number of possible sequences and structures, there is a wide range of binding affinities for a given target. A nucleic acid mixture comprising, for example, a 20 nucleotide randomized segment can have 4^{20} candidate possibilities. Those which have the higher affinity constants for the target are most likely to bind to the target. After partitioning, dissociation and amplification, a second nucleic acid mixture is generated, enriched for the higher binding affinity candidates. Additional rounds of selection progressively favor the best ligands until the resulting nucleic acid mixture is predominantly composed of only one or a few sequences. These can then be cloned, sequenced and individually tested for binding affinity as pure ligands or aptamers.

[0078] Cycles of selection and amplification are repeated until a desired goal is achieved. In the most general case, selection/amplification is continued until no significant improvement in binding strength is achieved on repetition of the cycle. The method is typically used to sample approximately 10^{14} different nucleic acid species but may be used to sample as many as about 10^{18} different nucleic acid species. Generally, nucleic acid aptamer molecules are selected in a 5 to 20 cycle procedure. In one embodiment, heterogeneity is introduced only in the initial selection stages and does not occur throughout the replicating process.

[0079] In one embodiment of SELEX™, the selection process is so efficient at isolating those nucleic acid ligands that bind most strongly to the selected target, that only one cycle of selection and amplification is required. Such an efficient selection may occur, for example, in a chromatographic-type process wherein the ability of nucleic acids to associate with targets bound on a column operates in such a manner that the column is sufficiently able to allow separation and isolation of the highest affinity nucleic acid ligands.

[0080] In many cases, it is not necessarily desirable to perform the iterative steps of SELEX™ until a single nucleic acid ligand is identified. The target-specific nucleic acid ligand solution may include a family of nucleic acid structures or motifs that have a number of conserved sequences and a number of sequences which can be substituted or added without significantly affecting the affinity of the nucleic acid ligands to the target. By

terminating the SELEX™ process prior to completion, it is possible to determine the sequence of a number of members of the nucleic acid ligand solution family.

[0081] A variety of nucleic acid primary, secondary and tertiary structures are known to exist. The structures or motifs that have been shown most commonly to be involved in non-Watson-Crick type interactions are referred to as hairpin loops, symmetric and asymmetric bulges, pseudoknots and myriad combinations of the same. Almost all known cases of such motifs suggest that they can be formed in a nucleic acid sequence of no more than 30 nucleotides. For this reason, it is often preferred that SELEX™ procedures with contiguous randomized segments be initiated with nucleic acid sequences containing a randomized segment of between about 20 to about 50 nucleotides and in some embodiments, about 30 to about 40 nucleotides. In one example, the 5'-fixed:random:3'-fixed sequence comprises a random sequence of about 30 to about 50 nucleotides.

[0082] The core SELEX™ method has been modified to achieve a number of specific objectives. For example, U.S. Patent No. 5,707,796 describes the use of SELEX™ in conjunction with gel electrophoresis to select nucleic acid molecules with specific structural characteristics, such as bent DNA. U.S. Patent No. 5,763,177 describes SELEX™ based methods for selecting nucleic acid ligands containing photo reactive groups capable of binding and/or photo-crosslinking to and/or photo-inactivating a target molecule. U.S. Patent No. 5,567,588 and U.S. Patent No. 5,861,254 describe SELEX™ based methods which achieve highly efficient partitioning between oligonucleotides having high and low affinity for a target molecule. U.S. Patent No. 5,496,938 describes methods for obtaining improved nucleic acid ligands after the SELEX™ process has been performed. U.S. Patent No. 5,705,337 describes methods for covalently linking a ligand to its target.

[0083] SELEX™ can also be used to obtain nucleic acid ligands that bind to more than one site on the target molecule, and to obtain nucleic acid ligands that include non-nucleic acid species that bind to specific sites on the target. SELEX™ provides means for isolating and identifying nucleic acid ligands which bind to any envisionable target, including large and small biomolecules such as nucleic acid-binding proteins and proteins not known to bind nucleic acids as part of their biological function as well as cofactors and other small molecules. For example, U.S. Patent No. 5,580,737 discloses nucleic acid sequences identified through SELEX™ which are capable of binding with high affinity to caffeine and the closely related analog, theophylline.

[0084] Counter-SELEX™ is a method for improving the specificity of nucleic acid ligands to a target molecule by eliminating nucleic acid ligand sequences with cross-reactivity to one or more non-target molecules. Counter- SELEX™ is comprised of the steps of: (a) preparing a candidate mixture of nucleic acids; (b) contacting the candidate mixture with the target, wherein nucleic acids having an increased affinity to the target relative to the candidate mixture may be partitioned from the remainder of the candidate mixture; (c) partitioning the increased affinity nucleic acids from the remainder of the candidate mixture; (d) dissociating the increased affinity nucleic acids from the target; (e) contacting the increased affinity nucleic acids with one or more non-target molecules such that nucleic acid ligands with specific affinity for the non-target molecule(s) are removed; and (f) amplifying the nucleic acids with specific affinity only to the target molecule to yield a mixture of nucleic acids enriched for nucleic acid sequences with a relatively higher affinity and specificity for binding to the target molecule. As described above for SELEX™, cycles of selection and amplification are repeated as necessary until a desired goal is achieved.

[0085] One potential problem encountered in the use of nucleic acids as therapeutics and vaccines is that oligonucleotides in their phosphodiester form may be quickly degraded in body fluids by intracellular and extracellular enzymes such as endonucleases and exonucleases before the desired effect is manifest. The SELEX™ method thus encompasses the identification of high-affinity nucleic acid ligands containing modified nucleotides conferring improved characteristics on the ligand, such as improved *in vivo* stability or improved delivery characteristics. Examples of such modifications include chemical substitutions at the ribose and/or phosphate and/or base positions. SELEX™-identified nucleic acid ligands containing modified nucleotides are described, *e.g.*, in U.S. Patent No. 5,660,985, which describes oligonucleotides containing nucleotide derivatives chemically modified at the 2' position of ribose, 5 position of pyrimidines, and 8 position of purines, U.S. Patent No. 5,756,703 which describes oligonucleotides containing various 2'-modified pyrimidines, and U.S. Patent No. 5,580,737 which describes highly specific nucleic acid ligands containing one or more nucleotides modified with 2'-amino (2'-NH_2), 2'-fluoro (2'-F), and/or 2'-O-methyl (2'-OMe) substituents.

[0086] Modifications of the nucleic acid ligands contemplated in this invention include, but are not limited to, those which provide other chemical groups that incorporate additional charge, polarizability, hydrophobicity, hydrogen bonding, electrostatic interaction, and

fluxionality to the nucleic acid ligand bases or to the nucleic acid ligand as a whole. Modifications to generate oligonucleotide populations which are resistant to nucleases can also include one or more substitute internucleotide linkages, altered sugars, altered bases, or combinations thereof. Such modifications include, but are not limited to, 2'-position sugar modifications, 5-position pyrimidine modifications, 8-position purine modifications, modifications at exocyclic amines, substitution of 4-thiouridine, substitution of 5-bromo or 5-iodo-uracil; backbone modifications, phosphorothioate or alkyl phosphate modifications, methylations, and unusual base-pairing combinations such as the isobases isocytidine and isoguanosine. Modifications can also include 3' and 5' modifications such as capping.

[0087] In one embodiment, oligonucleotides are provided in which the P(O)O group is replaced by P(O)S ("thioate"), P(S)S ("dithioate"), P(O)NR_2 ("amidate"), P(O)R, P(O)OR', CO or CH_2 ("formacetal") or 3'-amine (-NH-CH_2-CH_2-), wherein each R or R' is independently H or substituted or unsubstituted alkyl. Linkage groups can be attached to adjacent nucleotides through an -O-, -N-, or -S- linkage. Not all linkages in the oligonucleotide are required to be identical. As used herein, the term phosphorothioate encompasses one or more non-bridging oxygen atoms in a phosphodiester bond replaced by one or more sulfur atom.

[0088] In further embodiments, the oligonucleotides comprise modified sugar groups, for example, one or more of the hydroxyl groups is replaced with halogen, aliphatic groups, or functionalized as ethers or amines. In one embodiment, the 2'-position of the furanose residue is substituted by any of an O-methyl, O-alkyl, O-allyl, S-alkyl, S-allyl, or halo group. Methods of synthesis of 2'-modified sugars are described, *e.g.*, in Sproat, *et al.*, Nucl. Acid Res. 19:733-738 (1991); Cotten, *et al.*, Nucl. Acid Res. 19:2629-2635 (1991); and Hobbs, *et al.*, Biochemistry 12:5138-5145 (1973). Other modifications are known to one of ordinary skill in the art. Such modifications may be pre-SELEX™ process modifications or post-SELEX™ process modifications (modification of previously identified unmodified ligands) or may be made by incorporation into the SELEX™ process.

[0089] Pre- SELEX™ process modifications or those made by incorporation into the SELEX™ process yield nucleic acid ligands with both specificity for their SELEX™ target and improved stability, *e.g.*, *in vivo* stability. Post-SELEX™ process modifications made to nucleic acid ligands may result in improved stability, *e.g.*, *in vivo* stability without adversely affecting the binding capacity of the nucleic acid ligand.

[0090] The SELEX™ method encompasses combining selected oligonucleotides with other selected oligonucleotides and non-oligonucleotide functional units as described in U.S. Patent No. 5,637,459 and U.S. Patent No. 5,683,867. The SELEX™ method further encompasses combining selected nucleic acid ligands with lipophilic or non-immunogenic high molecular weight compounds in a diagnostic or therapeutic complex, as described, *e.g.*, in U.S. Patent No. 6,011,020, U.S. Patent No. 6,051,698, and PCT Publication No. WO 98/18480. These patents and applications teach the combination of a broad array of shapes and other properties, with the efficient amplification and replication properties of oligonucleotides, and with the desirable properties of other molecules.

[0091] The identification of nucleic acid ligands to small, flexible peptides via the SELEX™ method has also been explored. Small peptides have flexible structures and usually exist in solution in an equilibrium of multiple conformers, and thus it was initially thought that binding affinities may be limited by the conformational entropy lost upon binding a flexible peptide. However, the feasibility of identifying nucleic acid ligands to small peptides in solution was demonstrated in U.S. Patent No. 5,648,214. In this patent, high affinity RNA nucleic acid ligands to substance P, an 11 amino acid peptide, were identified.

[0092] The aptamers with specificity and binding affinity to the target(s) of the present invention are typically selected by the SELEX™ process as described herein. As part of the SELEX™ process, the sequences selected to bind to the target are then optionally minimized to determine the minimal sequence having the desired binding affinity. The selected sequences and/or the minimized sequences are optionally optimized by performing random or directed mutagenesis of the sequence to increase binding affinity or alternatively to determine which positions in the sequence are essential for binding activity. Additionally, selections can be performed with sequences incorporating modified nucleotides to stabilize the aptamer molecules against degradation *in vivo*.

2' MODIFIED SELEX™

[0093] In order for an aptamer to be suitable for use as a therapeutic, it is preferably inexpensive to synthesize, safe and stable *in vivo*. Wild-type RNA and DNA aptamers are typically not stable *in vivo* because of their susceptibility to degradation by nucleases. Resistance to nuclease degradation can be greatly increased by the incorporation of modifying groups at the 2'-position.

[0094] Fluoro and amino groups have been successfully incorporated into oligonucleotide pools from which aptamers have been subsequently selected. However, these modifications greatly increase the cost of synthesis of the resultant aptamer, and may introduce safety concerns in some cases because of the possibility that the modified nucleotides could be recycled into host DNA by degradation of the modified oligonucleotides and subsequent use of the nucleotides as substrates for DNA synthesis.

[0095] Aptamers that contain 2'-O-methyl ("2'-OMe") nucleotides, as provided herein, overcome many of these drawbacks. Oligonucleotides containing 2'-OMe nucleotides are nuclease-resistant and inexpensive to synthesize. Although 2'-OMe nucleotides are ubiquitous in biological systems, natural polymerases do not accept 2'-OMe NTPs as substrates under physiological conditions, thus there are no safety concerns over the recycling of 2'-OMe nucleotides into host DNA. The SELEX™ method used to generate 2'-modified aptamers is described, *e.g.*, in U.S. Provisional Patent Application Serial No. 60/430,761, filed December 3, 2002, U.S. Provisional Patent Application Serial No. 60/487,474, filed July 15, 2003, U.S. Provisional Patent Application Serial No. 60/517,039, filed November 4, 2003, U.S. Patent Application No. 10/729,581, filed December 3, 2003, and U.S. Patent Application No. 10/873,856, filed June 21, 2004, entitled "Method for *in vitro* Selection of 2'-O-methyl Substituted Nucleic Acids", each of which is herein incorporated by reference in its entirety.

[0096] The present invention includes aptamers that bind to and modulate the function of IL-23 and/or IL-12 which contain modified nucleotides (*e.g.*, nucleotides which have a modification at the 2' position) to make the oligonucleotide more stable than the unmodified oligonucleotide to enzymatic and chemical degradation as well as thermal and physical degradation. Although there are several examples of 2'-OMe containing aptamers in the literature (see, *e.g.*, Green *et al.*, Current Biology 2, 683-695, 1995) these were generated by the *in vitro* selection of libraries of modified transcripts in which the C and U residues were 2'-fluoro (2'-F) substituted and the A and G residues were 2'-OH. Once functional sequences were identified then each A and G residue was tested for tolerance to 2'-OMe substitution, and the aptamer was re-synthesized having all A and G residues which tolerated 2'-OMe substitution as 2'-OMe residues. Most of the A and G residues of aptamers generated in this two-step fashion tolerate substitution with 2'-OMe residues, although, on average, approximately 20% do not. Consequently, aptamers generated using this method

tend to contain from two to four 2'-OH residues, and stability and cost of synthesis are compromised as a result. By incorporating modified nucleotides into the transcription reaction which generate stabilized oligonucleotides used in oligonucleotide pools from which aptamers are selected and enriched by SELEX™ (and/or any of its variations and improvements, including those described herein), the methods of the present invention eliminate the need for stabilizing the selected aptamer oligonucleotides (*e.g.*, by resynthesizing the aptamer oligonucleotides with modified nucleotides).

[0097] In one embodiment, the present invention provides aptamers comprising combinations of 2'-OH, 2'-F, 2'-deoxy, and 2'-OMe modifications of the ATP, GTP, CTP, TTP, and UTP nucleotides. In another embodiment, the present invention provides aptamers comprising combinations of 2'-OH, 2'-F, 2'-deoxy, 2'-OMe, 2'-NH_2, and 2'-methoxyethyl modifications of the ATP, GTP, CTP, TTP, and UTP nucleotides. In another embodiment, the present invention provides aptamers comprising 5^6 combinations of 2'-OH, 2'-F, 2'-deoxy, 2'-OMe, 2'-NH_2, and 2'-methoxyethyl modifications of the ATP, GTP, CTP, TTP, and UTP nucleotides.

[0098] 2' modified aptamers of the invention are created using modified polymerases, *e.g.*, a modified T7 polymerase, having a rate of incorporation of modified nucleotides having bulky substituents at the furanose 2' position that is higher than that of wild-type polymerases. For example, a single mutant T7 polymerase (Y639F) in which the tyrosine residue at position 639 has been changed to phenylalanine readily utilizes 2'deoxy, 2'amino-, and 2'fluoro- nucleotide triphosphates (NTPs) as substrates and has been widely used to synthesize modified RNAs for a variety of applications. However, this mutant T7 polymerase reportedly can not readily utilize (*i.e.*, incorporate) NTPs with bulky 2'-substituents such as 2'-OMe or 2'-azido (2'-N_3) substituents. For incorporation of bulky 2' substituents, a double T7 polymerase mutant (Y639F/H784A) having the histidine at position 784 changed to an alanine residue in addition to the Y639F mutation has been described and has been used in limited circumstances to incorporate modified pyrimidine NTPs. See Padilla, R. and Sousa, R., Nucleic Acids Res., 2002, 30(24): 138. A single mutant T7 polymerase (H784A) having the histidine at position 784 changed to an alanine residue has also been described. Padilla *et al.*, Nucleic Acids Research, 2002, 30: 138. In both the Y639F/H784A double mutant and H784A single mutant T7 polymerases, the change to a

smaller amino acid residue such as alanine allows for the incorporation of bulkier nucleotide substrates, *e.g.*, 2'-OMe substituted nucleotides.

[0099] Generally, it has been found that under the conditions disclosed herein, the Y693F single mutant can be used for the incorporation of all 2'-OMe substituted NTPs except GTP and the Y639F/H784A double mutant can be used for the incorporation of all 2'-OMe substituted NTPs including GTP. It is expected that the H784A single mutant possesses properties similar to the Y639F and the Y639F/H784A mutants when used under the conditions disclosed herein.

[00100] 2'-modified oligonucleotides may be synthesized entirely of modified nucleotides, or with a subset of modified nucleotides. The modifications can be the same or different. All nucleotides may be modified, and all may contain the same modification. All nucleotides may be modified, but contain different modifications, *e.g.*, all nucleotides containing the same base may have one type of modification, while nucleotides containing other bases may have different types of modification. All purine nucleotides may have one type of modification (or are unmodified), while all pyrimidine nucleotides have another, different type of modification (or are unmodified). In this way, transcripts, or pools of transcripts are generated using any combination of modifications, including for example, ribonucleotides (2'-OH), deoxyribonucleotides (2'-deoxy), 2'-F, and 2'-OMe nucleotides. A transcription mixture containing 2'-OMe C and U and 2'-OH A and G is referred to as an "rRmY" mixture and aptamers selected therefrom are referred to as "rRmY" aptamers. A transcription mixture containing deoxy A and G and 2'-OMe U and C is referred to as a "dRmY" mixture and aptamers selected therefrom are referred to as "dRmY" aptamers. A transcription mixture containing 2'-OMe A, C, and U, and 2'-OH G is referred to as a "rGmH" mixture and aptamers selected therefrom are referred to as "rGmH" aptamers. A transcription mixture alternately containing 2'-OMe A, C, U and G and 2'-OMe A, U and C and 2'-F G is referred to as an "alternating mixture" and aptamers selected therefrom are referred to as "alternating mixture" aptamers. A transcription mixture containing 2'-OMe A, U, C, and G, where up to 10% of the G's are ribonucleotides is referred to as a "r/mGmH" mixture and aptamers selected therefrom are referred to as "r/mGmH" aptamers. A transcription mixture containing 2'-OMe A, U, and C, and 2'-F G is referred to as a "fGmH" mixture and aptamers selected therefrom are referred to as "fGmH" aptamers. A transcription mixture containing 2'-OMe A, U, and C, and deoxy G is referred to as a "dGmH" mixture and aptamers selected

therefrom are referred to as "dGmH" aptamers. A transcription mixture containing deoxy A, and 2'-OMe C, G and U is referred to as a "dAmB" mixture and aptamers selected therefrom are referred to as "dAmB" aptamers, and a transcription mixture containing all 2'-OH nucleotides is referred to as a "rN" mixture and aptamers selected therefrom are referred to as "rN" or "rRrY" aptamers. A "mRmY" aptamer is one containing all 2'-O-methyl nucleotides and is usually derived from a r/mGmH oligonucleotide by post-SELEX™ replacement, when possible, of any 2'-OH Gs with 2'-OMe Gs.

[00101] A preferred embodiment includes any combination of 2'-OH, 2'-deoxy and 2'-OMe nucleotides. A more preferred embodiment includes any combination of 2'-deoxy and 2'-OMe nucleotides. An even more preferred embodiment is with any combination of 2'-deoxy and 2'-OMe nucleotides in which the pyrimidines are 2'-OMe (such as dRmY, mRmY or dGmH).

[00102] Incorporation of modified nucleotides into the aptamers of the invention is accomplished before (pre-) the selection process (*e.g.*, a pre-SELEX™ process modification). Optionally, aptamers of the invention in which modified nucleotides have been incorporated by pre-SELEX™ process modification can be further modified by post-SELEX™ process modification (*i.e.*, a post-SELEX™ process modification after a pre-SELEX™ modification). Pre-SELEX™ process modifications yield modified nucleic acid ligands with specificity for the SELEX™ target and also improved *in vivo* stability. Post-SELEX™ process modifications, *i.e.*, modification (*e.g.*, truncation, deletion, substitution or additional nucleotide modifications of previously identified ligands having nucleotides incorporated by pre-SELEX™ process modification) can result in a further improvement of *in vivo* stability without adversely affecting the binding capacity of the nucleic acid ligand having nucleotides incorporated by pre-SELEX™ process modification.

[00103] To generate pools of 2'-modified (*e.g.*, 2'-OMe) RNA transcripts in conditions under which a polymerase accepts 2'-modified NTPs the preferred polymerase is the Y693F/H784A double mutant or the Y693F single mutant. Other polymerases, particularly those that exhibit a high tolerance for bulky 2'-substituents, may also be used in the present invention. Such polymerases can be screened for this capability by assaying their ability to incorporate modified nucleotides under the transcription conditions disclosed herein.

[00104] A number of factors have been determined to be important for the transcription conditions useful in the methods disclosed herein. For example, increases in the yields of

modified transcript are observed when a leader sequence is incorporated into the 5' end of a fixed sequence at the 5' end of the DNA transcription template, such that at least about the first 6 residues of the resultant transcript are all purines.

[00105] Another important factor in obtaining transcripts incorporating modified nucleotides is the presence or concentration of 2'-OH GTP. Transcription can be divided into two phases: the first phase is initiation, during which an NTP is added to the 3'-hydroxyl end of GTP (or another substituted guanosine) to yield a dinucleotide which is then extended by about 10-12 nucleotides; the second phase is elongation, during which transcription proceeds beyond the addition of the first about 10-12 nucleotides. It has been found that small amounts of 2'-OH GTP added to a transcription mixture containing an excess of 2'-OMe GTP are sufficient to enable the polymerase to initiate transcription using 2'-OH GTP, but once transcription enters the elongation phase the reduced discrimination between 2'-OMe and 2'-OH GTP, and the excess of 2'-OMe GTP over 2'-OH GTP allows the incorporation of principally the 2'-OMe GTP.

[00106] Another important factor in the incorporation of 2'-OMe substituted nucleotides into transcripts is the use of both divalent magnesium and manganese in the transcription mixture. Different combinations of concentrations of magnesium chloride and manganese chloride have been found to affect yields of 2'-O-methylated transcripts, the optimum concentration of the magnesium and manganese chloride being dependent on the concentration in the transcription reaction mixture of NTPs which complex divalent metal ions. To obtain the greatest yields of maximally 2' substituted O-methylated transcripts (*i.e.*, all A, C, and U and about 90% of G nucleotides), concentrations of approximately 5 mM magnesium chloride and 1.5 mM manganese chloride are preferred when each NTP is present at a concentration of 0.5 mM. When the concentration of each NTP is 1.0 mM, concentrations of approximately 6.5 mM magnesium chloride and 2.0 mM manganese chloride are preferred. When the concentration of each NTP is 2.0 mM, concentrations of approximately 9.6 mM magnesium chloride and 2.9 mM manganese chloride are preferred. In any case, departures from these concentrations of up to two-fold still give significant amounts of modified transcripts.

[00107] Priming transcription with GMP or guanosine is also important. This effect results from the specificity of the polymerase for the initiating nucleotide. As a result, the 5'-terminal nucleotide of any transcript generated in this fashion is likely to be 2'-OH G. The

preferred concentration of GMP (or guanosine) is 0.5 mM and even more preferably 1 mM. It has also been found that including PEG, preferably PEG-8000, in the transcription reaction is useful to maximize incorporation of modified nucleotides.

[00108] For maximum incorporation of 2'-OMe ATP (100%), UTP (100%), CTP (100%) and GTP (~90%) ("r/mGmH") into transcripts the following conditions are preferred: HEPES buffer 200 mM, DTT 40 mM, spermidine 2 mM, PEG-8000 10% (w/v), Triton X-100 0.01% (w/v), $MgCl_2$ 5 mM (6.5 mM where the concentration of each 2'-OMe NTP is 1.0 mM), $MnCl_2$ 1.5 mM (2.0 mM where the concentration of each 2'-OMe NTP is 1.0 mM), 2'-OMe NTP (each) 500 μM (more preferably, 1.0 mM), 2'-OH GTP 30 μM, 2'-OH GMP 500 μM, pH 7.5, Y639F/H784A T7 RNA Polymerase 15 units/mL, inorganic pyrophosphatase 5 units/mL, and an all-purine leader sequence of at least 8 nucleotides long. As used herein, one unit of the Y639F/H784A mutant T7 RNA polymerase (or any other mutant T7 RNA polymerase specified herein) is defined as the amount of enzyme required to incorporate 1 nmole of 2'-OMe NTPs into transcripts under the r/mGmH conditions. As used herein, one unit of inorganic pyrophosphatase is defined as the amount of enzyme that will liberate 1.0 mole of inorganic orthophosphate per minute at pH 7.2 and 25 °C.

[00109] For maximum incorporation (100%) of 2'-OMe ATP, UTP and CTP ("rGmH") into transcripts the following conditions are preferred: HEPES buffer 200 mM, DTT 40 mM, spermidine 2 mM, PEG-8000 10% (w/v), Triton X-100 0.01% (w/v), $MgCl_2$ 5 mM (9.6 mM where the concentration of each 2'-OMe NTP is 2.0 mM), $MnCl_2$ 1.5 mM (2.9 mM where the concentration of each 2'-OMe NTP is 2.0 mM), 2'-OMe NTP (each) 500 μM (more preferably, 2.0 mM), pH 7.5, Y639F T7 RNA Polymerase 15 units/mL, inorganic pyrophosphatase 5 units/mL, and an all-purine leader sequence of at least 8 nucleotides long.

[00110] For maximum incorporation (100%) of 2'-OMe UTP and CTP ("rRmY") into transcripts the following conditions are preferred: HEPES buffer 200 mM, DTT 40 mM, spermidine 2 mM, PEG-8000 10% (w/v), Triton X-100 0.01% (w/v), $MgCl_2$ 5 mM (9.6 mM where the concentration of each 2'-OMe NTP is 2.0 mM), $MnCl_2$ 1.5 mM (2.9 mM where the concentration of each 2'-OMe NTP is 2.0 mM), 2'-OMe NTP (each) 500μM (more preferably, 2.0 mM), pH 7.5, Y639F/H784A T7 RNA Polymerase 15 units/mL, inorganic pyrophosphatase 5 units/mL, and an all-purine leader sequence of at least 8 nucleotides long.

[00111] For maximum incorporation (100%) of deoxy ATP and GTP and 2'-OMe UTP and CTP ("dRmY") into transcripts the following conditions are preferred: HEPES buffer

200 mM, DTT 40 mM, spermine 2 mM, spermidine 2 mM, PEG-8000 10% (w/v), Triton X-100 0.01% (w/v), $MgCl_2$ 9.6 mM, $MnCl_2$ 2.9 mM, 2'-OMe NTP (each) 2.0 mM, pH 7.5, Y639F T7 RNA Polymerase 15 units/mL, inorganic pyrophosphatase 5 units/mL, and an all-purine leader sequence of at least 8 nucleotides long.

[00112] For maximum incorporation (100%) of 2'-OMe ATP, UTP and CTP and 2'-F GTP ("fGmH") into transcripts the following conditions are preferred: HEPES buffer 200 mM, DTT 40 mM, spermidine 2 mM, PEG-8000 10% (w/v), Triton X-100 0.01% (w/v), $MgCl_2$ 9.6 mM, $MnCl_2$ 2.9 mM, 2'-OMe NTP (each) 2.0 mM, pH 7.5, Y639F T7 RNA Polymerase 15 units/mL, inorganic pyrophosphatase 5 units/mL, and an all-purine leader sequence of at least 8 nucleotides long.

[00113] For maximum incorporation (100%) of deoxy ATP and 2'-OMe UTP, GTP and CTP ("dAmB") into transcripts the following conditions are preferred: HEPES buffer 200 mM, DTT 40 mM, spermidine 2 mM, PEG-8000 10% (w/v), Triton X-100 0.01% (w/v), $MgCl_2$ 9.6 mM, $MnCl_2$ 2.9 mM, 2'-OMe NTP (each) 2.0 mM, pH 7.5, Y639F T7 RNA Polymerase 15 units/mL, inorganic pyrophosphatase 5 units/mL, and an all-purine leader sequence of at least 8 nucleotides long.

[00114] For each of the above (a) transcription is preferably performed at a temperature of from about 20 °C to about 50 °C, preferably from about 30 °C to 45 °C, and more preferably at about 37 °C for a period of at least two hours and (b) 50-300 nM of a double stranded DNA transcription template is used (200 nM template is used in round 1 to increase diversity (300 nM template is used in dRmY transcriptions)), and for subsequent rounds approximately 50 nM, a 1/10 dilution of an optimized PCR reaction, using conditions described herein, is used). The preferred DNA transcription templates are described below (where ARC254 and ARC256 transcribe under all 2'-OMe conditions and ARC255 transcribes under rRmY conditions).

SEQ ID NO 1 (ARC254)
5'-CATCGATGCTAGTCGTAACGATCCNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNCGAGAACGTTCTCTCCTCTCCCTAT AGTGAGTCGTATTA-3'

SEQ ID NO 2 (ARC255)
5'-CATGCATCGCGACTGACTAGCCGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGTAGAACGTTCTCTCCTCTCCCTATA GTGAGTCGTATTA-3'

SEQ ID NO 3 (ARC256)
5'-CATCGATCGATCGATCGACAGCGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGTAGAACGTTCTCTCCTCTCCCTATA GTGAGTCGTATTA-3'

[00115] Under rN transcription conditions of the present invention, the transcription reaction mixture comprises 2′-OH adenosine triphosphates (ATP), 2′-OH guanosine triphosphates (GTP), 2′-OH cytidine triphosphates (CTP), and 2′-OH uridine triphosphates (UTP). The modified oligonucleotides produced using the rN transcription mixtures of the present invention comprise substantially all 2′-OH adenosine, 2′-OH guanosine, 2′-OH cytidine, and 2′-OH uridine. In a preferred embodiment of rN transcription, the resulting modified oligonucleotides comprise a sequence where at least 80% of all adenosine nucleotides are 2′-OH adenosine, at least 80% of all guanosine nucleotides are 2′-OH guanosine, at least 80% of all cytidine nucleotides are 2′-OH cytidine, and at least 80% of all uridine nucleotides are 2′-OH uridine. In a more preferred embodiment of rN transcription, the resulting modified oligonucleotides of the present invention comprise a sequence where at least 90% of all adenosine nucleotides are 2′-OH adenosine, at least 90% of all guanosine nucleotides are 2′-OH guanosine, at least 90% of all cytidine nucleotides are 2′-OH cytidine, and at least 90% of all uridine nucleotides are 2′-OH uridine. In a most preferred embodiment of rN transcription, the modified oligonucleotides of the present invention comprise a sequence where 100% of all adenosine nucleotides are 2′-OH adenosine, 100% of all guanosine nucleotides are 2′-OH guanosine, 100% of all cytidine nucleotides are 2′-OH cytidine, and 100% of all uridine nucleotides are 2′-OH uridine.

[00116] Under rRmY transcription conditions of the present invention, the transcription reaction mixture comprises 2′-OH adenosine triphosphates, 2′-OH guanosine triphosphates, 2′-O-methyl cytidine triphosphates, and 2′-O-methyl uridine triphosphates. The modified oligonucleotides produced using the rRmY transcription mixtures of the present invention comprise substantially all 2′-OH adenosine, 2′-OH guanosine, 2′-O-methyl cytidine and 2′-O-methyl uridine. In a preferred embodiment, the resulting modified oligonucleotides comprise a sequence where at least 80% of all adenosine nucleotides are 2′-OH adenosine, at least 80% of all guanosine nucleotides are 2′-OH guanosine, at least 80% of all cytidine nucleotides are 2′-O-methyl cytidine and at least 80% of all uridine nucleotides are 2′-O-methyl uridine. In a more preferred embodiment, the resulting modified oligonucleotides comprise a sequence where at least 90% of all adenosine nucleotides are 2′-OH adenosine, at least 90% of all guanosine nucleotides are 2′-OH guanosine, at least 90% of all cytidine nucleotides are 2′-O-methyl cytidine and at least 90% of all uridine nucleotides are 2′-O-

methyl uridine In a most preferred embodiment, the resulting modified oligonucleotides comprise a sequence where 100% of all adenosine nucleotides are 2′-OH adenosine, 100% of all guanosine nucleotides are 2′-OH guanosine, 100% of all cytidine nucleotides are 2′-O-methyl cytidine and 100% of all uridine nucleotides are 2′-O-methyl uridine.

[00117] Under dRmY transcription conditions of the present invention, the transcription reaction mixture comprises 2′-deoxy adenosine triphosphates, 2'-deoxy guanosine triphosphates, 2′-O-methyl cytidine triphosphates, and 2'-O-methyl uridine triphosphates. The modified oligonucleotides produced using the dRmY transcription conditions of the present invention comprise substantially all 2'-deoxy adenosine, 2'-deoxy guanosine, 2′-O-methyl cytidine, and 2'-O-methyl uridine. In a preferred embodiment, the resulting modified oligonucleotides of the present invention comprise a sequence where at least 80% of all adenosine nucleotides are 2'-deoxy adenosine, at least 80% of all guanosine nucleotides are 2'-deoxy guanosine, at least 80% of all cytidine nucleotides are 2′-O-methyl cytidine, and at least 80% of all uridine nucleotides are 2'-O-methyl uridine. In a more preferred embodiment, the resulting modified oligonucleotides of the present invention comprise a sequence where at least 90% of all adenosine nucleotides are 2'-deoxy adenosine, at least 90 % of all guanosine nucleotides are 2'-deoxy guanosine, at least 90% of all cytidine nucleotides are 2'-O-methyl cytidine, and at least 90% of all uridine nucleotides are 2′-O-methyl uridine. In a most preferred embodiment, the resulting modified oligonucleotides of the present invention comprise a sequence where 100% of all adenosine nucleotides are 2'-deoxy adenosine, 100% of all guanosine nucleotides are 2'-deoxy guanosine, 100% of all cytidine nucleotides are 2'-O-methyl cytidine, and 100% of all uridine nucleotides are 2′-O-methyl uridine.

[00118] Under rGmH transcription conditions of the present invention, the transcription reaction mixture comprises 2′-OH guanosine triphosphates, 2′-O-methyl cytidine triphosphates, 2′-O-methyl uridine triphosphates, and 2′-O-methyl adenosine triphosphates. The modified oligonucleotides produced using the rGmH transcription mixtures of the present invention comprise substantially all 2′-OH guanosine, 2′-O-methyl cytidine, 2′-O-methyl uridine, and 2′-O-methyl adenosine. In a preferred embodiment, the resulting modified oligonucleotides comprise a sequence where at least 80% of all guanosine nucleotides are 2′-OH guanosine, at least 80% of all cytidine nucleotides are 2′-O-methyl

cytidine, at least 80% of all uridine nucleotides are 2′-O-methyl uridine, and at least 80% of all adenosine nucleotides are 2′-O-methyl adenosine. In a more preferred embodiment, the resulting modified oligonucleotides comprise a sequence where at least 90% of all guanosine nucleotides are 2′-OH guanosine, at least 90% of all cytidine nucleotides are 2′-O-methyl cytidine, at least 90% of all uridine nucleotides are 2′-O-methyl uridine, and at least 90% of all adenosine nucleotides are 2′-O-methyl adenosine. In a most preferred embodiment, the resulting modified oligonucleotides comprise a sequence where 100% of all guanosine nucleotides are 2′-OH guanosine, 100% of all cytidine nucleotides are 2′-O-methyl cytidine, 100% of all uridine nucleotides are 2′-O-methyl uridine, and 100% of all adenosine nucleotides are 2′-O-methyl adenosine.

[00119] Under r/mGmH transcription conditions of the present invention, the transcription reaction mixture comprises 2′-O-methyl adenosine triphosphate, 2′-O-methyl cytidine triphosphate, 2′-O-methyl guanosine triphosphate, 2′-O-methyl uridine triphosphate and 2'-OH guanosine triphosphate. The resulting modified oligonucleotides produced using the r/mGmH transcription mixtures of the present invention comprise substantially all 2′-O-methyl adenosine, 2′-O-methyl cytidine, 2′-O-methyl guanosine, and 2′-O-methyl uridine, wherein the population of guanosine nucleotides has a maximum of about 10% 2'-OH guanosine. In a preferred embodiment, the resulting r/mGmH modified oligonucleotides of the present invention comprise a sequence where at least 80% of all adenosine nucleotides are 2′-O-methyl adenosine, at least 80% of all cytidine nucleotides are 2′-O-methyl cytidine, at least 80% of all guanosine nucleotides are 2′-O-methyl guanosine, at least 80% of all uridine nucleotides are 2′-O-methyl uridine, and no more than about 10% of all guanosine nucleotides are 2'-OH guanosine. In a more preferred embodiment, the resulting modified oligonucleotides comprise a sequence where at least 90% of all adenosine nucleotides are 2′-O-methyl adenosine, at least 90% of all cytidine nucleotides are 2′-O-methyl cytidine, at least 90% of all guanosine nucleotides are 2′-O-methyl guanosine, at least 90% of all uridine nucleotides are 2′-O-methyl uridine, and no more than about 10% of all guanosine nucleotides are 2'-OH guanosine. In a most preferred embodiment, the resulting modified oligonucleotides comprise a sequence where 100% of all adenosine nucleotides are 2′-O-methyl adenosine, 100% of all cytidine nucleotides are 2′-O-methyl cytidine, 90% of all guanosine nucleotides are 2′-O-methyl guanosine, and 100% of all uridine nucleotides are 2′-

O-methyl uridine, and no more than about 10% of all guanosine nucleotides are 2'-OH guanosine.

[00120] Under fGmH transcription conditions of the present invention, the transcription reaction mixture comprises 2′-O-methyl adenosine triphosphates, 2′-O-methyl uridine triphosphates, 2′-O-methyl cytidine triphosphates, and 2′-F guanosine triphosphates. The modified oligonucleotides produced using the fGmH transcription conditions of the present invention comprise substantially all 2′-O-methyl adenosine, 2′-O-methyl uridine, 2′-O-methyl cytidine, and 2′-F guanosine. In a preferred embodiment, the resulting modified oligonucleotides comprise a sequence where at least 80% of all adenosine nucleotides are 2′-O-methyl adenosine, at least 80% of all uridine nucleotides are 2′-O-methyl uridine, at least 80% of all cytidine nucleotides are 2′-O-methyl cytidine, and at least 80% of all guanosine nucleotides are 2′-F guanosine. In a more preferred embodiment, the resulting modified oligonucleotides comprise a sequence where at least 90% of all adenosine nucleotides are 2′-O-methyl adenosine, at least 90% of all uridine nucleotides are 2′-O-methyl uridine, at least 90% of all cytidine nucleotides are 2′-O-methyl cytidine, and at least 90% of all guanosine nucleotides are 2′-F guanosine. In a most preferred embodiment, the resulting modified oligonucleotides comprise a sequence where 100% of all adenosine nucleotides are 2′-O-methyl adenosine, 100% of all uridine nucleotides are 2′-O-methyl uridine, 100% of all cytidine nucleotides are 2′-O-methyl cytidine, and 100% of all guanosine nucleotides are 2′-F guanosine.

[00121] Under dAmB transcription conditions of the present invention, the transcription reaction mixture comprises 2′-deoxy adenosine triphosphates, 2′-O-methyl cytidine triphosphates, 2′-O-methyl guanosine triphosphates, and 2′-O-methyl uridine triphosphates. The modified oligonucleotides produced using the dAmB transcription mixtures of the present invention comprise substantially all 2′-deoxy adenosine, 2′-O-methyl cytidine, 2′-O-methyl guanosine, and 2′-O-methyl uridine. In a preferred embodiment, the resulting modified oligonucleotides comprise a sequence where at least 80% of all adenosine nucleotides are 2′-deoxy adenosine, at least 80% of all cytidine nucleotides are 2′-O-methyl cytidine, at least 80% of all guanosine nucleotides are 2′-O-methyl guanosine, and at least 80% of all uridine nucleotides are 2′-O-methyl uridine. In a more preferred embodiment, the resulting modified oligonucleotides comprise a sequence where at least 90% of all adenosine

nucleotides are 2′-deoxy adenosine, at least 90% of all cytidine nucleotides are 2′-O-methyl cytidine, at least 90% of all guanosine nucleotides are 2′-O-methyl guanosine, and at least 90% of all uridine nucleotides are 2′-O-methyl uridine. In a most preferred embodiment, the resulting modified oligonucleotides of the present invention comprise a sequence where 100% of all adenosine nucleotides are 2′-deoxy adenosine, 100% of all cytidine nucleotides are 2′-O-methyl cytidine, 100% of all guanosine nucleotides are 2′-O-methyl guanosine, and 100% of all uridine nucleotides are 2′-O-methyl uridine.

[00122] In each case, the transcription products can then be used as the library in the SELEX™ process to identify aptamers and/or to determine a conserved motif of sequences that have binding specificity to a given target. The resulting sequences are already partially stabilized, eliminating this step from the process to arrive at an optimized aptamer sequence and giving a more highly stabilized aptamer as a result. Another advantage of the 2'-OMe SELEX™ process is that the resulting sequences are likely to have fewer 2'-OH nucleotides required in the sequence, possibly none. To the extent 2'OH nucleotides remain they can be removed by performing post-SELEX™ modifications.

[00123] As described below, lower but still useful yields of transcripts fully incorporating 2' substituted nucleotides can be obtained under conditions other than the optimized conditions described above. For example, variations to the above transcription conditions include:

[00124] The HEPES buffer concentration can range from 0 to 1 M. The present invention also contemplates the use of other buffering agents having a pKa between 5 and 10 including, for example, Tris-hydroxymethyl-aminomethane.

[00125] The DTT concentration can range from 0 to 400 mM. The methods of the present invention also provide for the use of other reducing agents including, for example, mercaptoethanol.

[00126] The spermidine and/or spermine concentration can range from 0 to 20 mM.

[00127] The PEG-8000 concentration can range from 0 to 50 % (w/v). The methods of the present invention also provide for the use of other hydrophilic polymer including, for example, other molecular weight PEG or other polyalkylene glycols.

40-4e

[00128] The Triton X-100 concentration can range from 0 to 0.1% (w/v). The methods of the present invention also provide for the use of other non-ionic detergents including, for example, other detergents, including other Triton-X detergents.

[00129] The $MgCl_2$ concentration can range from 0.5 mM to 50 mM. The $MnCl_2$ concentration can range from 0.15 mM to 15 mM. Both $MgCl_2$ and $MnCl_2$ must be present within the ranges described and in a preferred embodiment are present in about a 10 to about 3 ratio of $MgCl_2$:$MnCl_2$, preferably, the ratio is about 3-5:1, more preferably, the ratio is about 3-4:1.

[00130] The 2'-OMe NTP concentration (each NTP) can range from 5 μM to 5 mM.

[00131] The 2'-OH GTP concentration can range from 0 μM to 300 μM.

[00132] The 2'-OH GMP concentration can range from 0 to 5 mM.

[00133] The pH can range from pH 6 to pH 9. The methods of the present invention can be practiced within the pH range of activity of most polymerases that incorporate modified nucleotides. In addition, the methods of the present invention provide for the optional use of chelating agents in the transcription reaction condition including, for example, EDTA, EGTA, and DTT.

IL-23 AND/OR IL-12 APTAMER SELECTION STRATEGIES.

[00134] The present invention provides aptamers that bind to human IL-23 and/or IL-12 and in some embodiments, inhibit binding to their receptor and/or otherwise modulate their function. Human IL-23 and IL-12 are both heterodimers that have one subunit in common and one unique. The subunit in common is the p40 subunit which contains the following amino acid sequence (Accession # AF180563) (SEQ ID NO 4):

MCHQQLVISWFSLVFLASPLVAIWELKKDVYVVELDWYPDAPGE

MVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSL
L

LLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSS
R

GSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVH
KL

KYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQ

VQGKSKRHKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCS.

[0001] The p19 subunit is unique to IL-23 and contains the following amino acid sequence (Accession # BC067511) (SEQ ID NO 5):

MLGSRAVMLLLLLPWTAQGRAVPGGSSPAWTQCQQLSQKLCTLA

WSAHPLVGHMDLREEGDEETTNDVPHIQCGDGCDPQGLRDNSQFCLQRIHQGLIFYE
K

LLGSDIFTGEPSLLPDSPVGQLHASLLGLSQLLQPEGHHWETQQIPSLSPSQPWQRLL

LRFKILRSLQAFVAVAARVFAHGAATLSP.

[00135] The p35 subunit is unique to IL-12 and contains the following amino acid sequence (Accession # AF180562) (SEQ ID NO 6):

MWPPGSASQPPPSPAAATGLHPAARPVSLQCRLSMCPARSLLLV

ATLVLLDHLSLARNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSE
E

IDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSS

IYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSS
LE

EPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS.

[00136] The present invention also provides aptamers that bind to mouse IL-23 and/or IL-12 and in some embodiments, inhibit binding to their receptor and/or otherwise modulate their function. Like human, mouse IL-23 and IL-12 are both heterodimers that share the mouse p40 subunit, while the mouse p19 subunit is specific to mouse IL-23 and the mouse p35 subunit is unique to mouse IL-12. The mouse p40 subunit contains the following amino acid sequence (Accession # P43432) (SEQ ID NO 315):

MCPQKLTISWFAIVLLVSPLMAMWELEKDVYVVEVDWTPDAPGETVNLTCDTPEED

DITWTSDQRHGVIGSGKTLTITVKEFLDAGQYTCHKGGETLSHSHLLLHKKENGIWS

TEILKNFKNKTFLKCEAPNYSGRFTCSWLVQRNMDLKFNIKSSSSSPDSRAVTCGMA

SLSAEKVTLDQRDYEKYSVSCQEDVTCPTAEETLPIELALEARQQNKYENYSTSFFIR

DIIKPDPPKNLQMKPLKNSQVEVSWEYPDSWSTPHSYFSLKFFVRIQRKKEKMKETE

EGCNQKGAFLVEKTSTEVQCKGGNVCVQAQDRYYNSSCSKWACVPCRVRS

[00137] The mouse p19 subunit contains the following amino acid sequence (Accession # NP112542) (SEQ ID NO 316):

MLDCRAVIMLWLLPWVTQGLAVPRSSSPDWAQCQQLSRNLCMLAWNAHAP

AGHMNLLREEEDEETKNNVPRIQCEDGCDPQGLKDNSQFCLQRIRQGLAF

YKHLLDSDIF KGEPALLPDSPMEQLHTSLLGLSQLLQPEDHPRETQQMPS

LSSSQQWQRPLLRSKILRSLQAFLAIAARVFAHGAATLTE PLVPTA.

[00138] The mouse p35 subunit contains the following amino acid sequence (Accession # P43431) (SEQ ID NO 317):

MCQSRYLLFLATLALLNHLSLARVIPVSGPARCLSQSRNLLKTTDDMVKTAREKLKH

YSCTAEDIDHEDITRDQTSTLKTCLPLELHKNESCLATRETSSTTRGSCLPPQKTSLM

MTLCL

GSIYEDLKMYQTEFQAINAALQNHNHQQIILDKGMLVAIDELMQSLNHNGETLRQKP

PVGEADPYRVKMKLCILLHAFST RVVTINRVMG YLSSA

[00139] Several SELEX™ strategies can be employed to generate aptamers with a variety of specificities for IL-23 and IL-12. One scheme produces aptamers specific for IL-23 over IL-12 by including IL-12 in a negative selection step. This eliminates sequences that recognize the common subunit, p40 (SEQ ID NO 4), and selects for aptamers specific to IL-23, or the p19 subunit (SEQ ID NO 5) as shown in Figure 3. One scheme produces aptamers specific for IL-12 over IL-23 by including IL-23 in the negative selection step. This eliminates sequences that recognize the common subunit, p40 (SEQ ID NO 4) and selects for aptamers specific for IL-12, or the p35 subunit (SEQ ID NO 6). A separate selection in which IL-23 and IL-12 are alternated every other round elicits aptamers that recognize the common subunit, p40 (SEQ ID NO 4), and therefore recognizes both proteins. Once sequences with the desired binding specificity are found, minimization of those sequences can be undertaken

to systematically reduce the size of the sequences with concomitant improvement in binding characteristics.

[00140] The selected aptamers having the highest affinity and specific binding as demonstrated by biological assays as described in the examples below are suitable therapeutics for treating conditions in which IL-23 and/or IL-12 is involved in pathogenesis.

IL-23/IL-12 SPECIFIC BINDING APTAMERS

[00141] The materials of the present invention comprise a series of nucleic acid aptamers of ~25-90 nucleotides in length which bind specifically to cytokines of the human IL-12 cytokine family which includes IL-12, IL-23, and IL-27; p19, p35, and p40 subunit monomers; and p40 subunit dimers; and which functionally modulate, e.g., block, the activity of IL-23 and/or IL-12 in *in vivo* and/or in cell-based assays.

[00142] Aptamers specifically capable of binding and modulating IL-23 and/or IL-12 are set forth herein. These aptamers provide a low-toxicity, safe, and effective modality of treating and/or preventing autoimmune and inflammatory related diseases or disorders. In one embodiment, the aptamers of the invention are used to treat and/or prevent inflammatory and autoimmune diseases, including but not limited to, multiple sclerosis, rheumatoid arthritis, psoriasis vulgaris, and irritable bowel disease, including without limitation Crohn's disease, and ulcerative colitis, each of which are known to be caused by or otherwise associated with the IL-23 and/or IL-12 cytokine. In another embodiment, the aptamers of the invention are used to treat and/or prevent Type I Diabetes, which is known to be caused by or otherwise associated with the IL-23 and/or IL-12 cytokine. In another embodiment, the aptamers of the invention are used to treat and/or prevent other indications for which activation of cytokine receptor binding is desirable including, for example, systemic lupus erythamatosus, colon cancer, lung cancer, and bone resorption in osteoporosis.

[00143] Examples of IL-23 and/or IL-12 specific binding aptamers for use as therapeutics and/or diagnostics include the following sequences listed below.

[00144] Unless noted otherwise, ARC489 (SEQ ID NO 91), ARC491 (SEQ ID NO 94), ARC621 (SEQ ID NO 108), ARC627 (SEQ ID NO 110), ARC527 (SEQ ID NO 159), ARC792 (SEQ ID NO 162), ARC794 (SEQ ID NO 164), ARC795 (SEQ ID NO 165), ARC979 (SEQ ID NO 177), ARC1386 (SEQ ID NO 224), and ARC1623-ARC1625 (SEQ

ID NOs 309-311) represent the sequences of the aptamers that bind to IL-23 and/or IL-12 that were selected under SELEX™ conditions in which the purines (A and G) are deoxy, and the pyrimidines (C and U) are 2'-OMe.

[00145] The unique sequence region of ARC489 (SEQ ID NO 91) and ARC491 (SEQ ID NO 94) begins at nucleotide 23, immediately following the sequence GGGAGAGGAGAGAACGUUCUAC (SEQ ID NO 69), and runs until it meets the 3'fixed nucleic acid sequence GCUGUCGAUCGAUCGAUCGAUG (SEQ ID NO 90).

[00146] The unique sequence region of ARC621 (SEQ ID NO 108) and ARC627 (SEQ ID NO 110) begins at nucleotide 23, immediately following the sequence GGGAGAGGAGAGAACGUUCUAC (SEQ ID NO 101), and runs until it meets the 3'fixed nucleic acid sequence GUCGAUCGAUCGAUCAUCGAUG (SEQ ID NO 102).

SEQ ID NO 91 (ARC489)
GGGAGAGGAGAGAACGUUCUACAGCGCCGGUGGGCGGGCAUUGGGUGGAUGCGCUGUCGAUCGAUCGAUCGAUG

SEQ ID NO 94 (ARC491)
GGGAGAGGAGAGAACGUUCUACAGCGCCGGUGGGUGGGCAUUGGGUGGAUGCGCUGUCGAUCGAUCGAUCGAUG

SEQ ID NO 108 (ARC621)
GGGAGAGGAGAGAACGUUCUACAGGCGGUUACGGGGGAUGCGGGUGGGACAGGUCGAUCGAUCGAUCAUCGAUG

SEQ ID NO 110 (ARC627)
GGGAGAGGAGAGAACGUUCUACAGGCAAGUAAUUGGGGAGUGCGGGCGGGGUGUCGAUCGAUCGAUCAUCGAUG

SEQ ID NO 159 (ARC527)
ACAGCGCCGGUGGGCGGGCAUUGGGUGGAUGCGCUGU

SEQ ID NO 162 (ARC792)
GGCAAGUAAUUGGGGAGUGCGGGCGGGG

SEQ ID NO 164 (ARC794)
GGCGGUACGGGGAGUGUGGGUUGGGGCCGG

SEQ ID NO 165 (ARC795)
CGAUAUAGGCGGUACGGGGGGAGUGGGCUGGGGUCG

SEQ ID NO 177 (ARC979)
ACAGGCAAGUAAUUGGGGAGUGCGGGCGGGGUGU

[00147] ARC1623 (SEQ ID NO 309), ARC1624 (SEQ ID NO 310) and ARC1625 (SEQ ID NO 311) represent optimized sequences based on ARC979 (SEQ ID NO 177), where "d"

stands for deoxy, "m" stands for 2'-O-methyl, "s" indicates a phosphorothioate internucleotide linkage, and "3T" stands for a 3'-inverted deoxy thymidine.

SEQ ID NO 309 (ARC1623)

dAmCsAsGdGmCsAsAsGmUsAsAmUmUdGmGmG-s-dG-s-dA-s-dGmU-s-dGmCmGmGdGmCdGdGmGmGmUdGmU-3T

SEQ ID NO 310 (ARC1624)

dAmCsAsGdGmCsAsAsGmUsAsAmUmUdGmGmGdGdAdGmUdGmCmGmG-s-dGmC-s-dG-s-dGmGmGmUdGmU-3T

SEQ ID NO 311 (ARC1625)

dAmCsAsGdGmCsAsAsGmUsAsAmUmUdGmGmGdGdAdGmUdGmCmGmGdGmCdGdGmGmGmU-s-dGmU-3T

[00148] SEQ ID NOS 139-140, SEQ ID NOS 144-145, SEQ ID NO 147, and SEQ ID NOS 151-152, represent the sequences of the aptamers that bind to IL-23 and/or IL-12 that were selected under SELEX™ conditions in which the purines (A and G) are 2'-OH (ribo) and the pyrimidines (C and U) are 2'-Fluoro.

SEQ ID NO 139 (A10.min5)
GGAGCAUACACAAGAAGUUUUUUGUGCUCUGAGUACUCAGCGUCCGUAAGGGAUAUGCUCC

SEQ ID NO 140 (A10.min6)
GGAGUACGCCGAAAGGCGCUCUGAGUACUCAGCGUCCGUAAGGGAUACUCC

SEQ ID NO 144 (B10.min4)
GGAGCAUACACAAGAAGUGCUUCAUGCGGCAAACUGCAUGACGUCGAAUAGAUAUGCUCC

SEQ ID NO 145 (B10.min5)
GGAGUACACAAGAAGUGCUUCCGAAAGGACGUCGAAUAGAUACUCC

SEQ ID NO 147 (F11.min2)
GGACAUACACAAGAUGUGCUUGAGUUAAAUCUCAUCGUCCCCGUUUGGGGAUAUGUC

SEQ ID NO 151
GGGUACGCCGAAAGGCGCUUCCGAAAGGACGUCCGUAAGGGAUACCC

SEQ ID NO 152
GGAGUACGCCGAAAGGCGCUUCCGAAAGGACGUCCGUAAGGGAUACUCC

[00149] Other aptamers that bind IL-23 and/or IL-12 are described below in Examples 1-3.

[00150] These aptamers may include modifications as described herein including e.g., conjugation to lipophilic or high molecular weight compounds (e.g., PEG), incorporation of a

CpG motif, incorporation of a capping moiety, incorporation of modified nucleotides, and incorporation of phosphorothioate in the phosphate backbone.

[00151] In one embodiment, an isolated, non-naturally occurring aptamer that binds to IL-23 and/or IL-12 is provided. In some embodiments, the isolated, non-naturally occurring aptamer has a dissociation constant ("K_D") for IL-23 and/or IL-12 of less than 100 μM, less than 1 μM, less than 500 nM, less than 100 nM, less than 50 nM , less than 1 nM, less than 500 pM, less than 100 pM, and less than 50 pM. In some embodiments of the invention, the dissociation constant is determined by dot blot titration as described in Example 1 below.

[00152] In another embodiment, the aptamer of the invention modulates a function of IL-23 and/or IL-12. In another embodiment, the aptamer of the invention inhibits an IL-23 and/or IL-12 function while in another embodiment the aptamer stimulates a function of the target. In another embodiment of the invention, the aptamer binds and/or modulates a function of an IL-23 or IL-12 variant. An IL-23 or IL-12 variant as used herein encompasses variants that perform essentially the same function as an IL-23 or IL-12 function, preferably comprises substantially the same structure and in some embodiments comprises at least 70% sequence identity, preferably at least 80% sequence identity, more preferably at least 90% sequence identity, and more preferably at least 95% sequence identity to the amino acid sequence of IL-23 or IL-12. In some embodiments of the invention, the sequence identity of target variants is determined using BLAST as described below.

[00153] The terms "sequence identity" in the context of two or more nucleic acid or protein sequences, refer to two or more sequences or subsequences that are the same or have a specified percentage of amino acid residues or nucleotides that are the same, when compared and aligned for maximum correspondence, as measured using one of the following sequence comparison algorithms or by visual inspection. For sequence comparison, typically one sequence acts as a reference sequence to which test sequences are compared. When using a sequence comparison algorithm, test and reference sequences are input into a computer, subsequence coordinates are designated if necessary, and sequence algorithm program parameters are designated. The sequence comparison algorithm then calculates the percent sequence identity for the test sequence(s) relative to the reference sequence, based on the designated program parameters. Optimal alignment of sequences for comparison can be conducted, *e.g.*, by the local homology algorithm of Smith & Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2: 482 (1981), by the homology alignment algorithm of Needleman & Wunsch, J Mol. Biol. 48:

443 (1970), by the search for similarity method of Pearson & Lipman, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85: 2444 (1988), by computerized implementations of these algorithms (GAP, BESTFIT, FASTA, and TFASTA in the Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.), or by visual inspection (see generally, Ausubel *et al.*, infra).

[00154] One example of an algorithm that is suitable for determining percent sequence identity is the algorithm used in the basic local alignment search tool (hereinafter "BLAST"), see, *e.g.* Altschul *et al.*, J Mol. Biol. 215: 403-410 (1990) and Altschul *et al.*, Nucleic Acids Res., 15: 3389-3402 (1997). Software for performing BLAST analyses is publicly available through the National Center for Biotechnology Information (hereinafter "NCBI"). The default parameters used in determining sequence identity using the software available from NCBI, *e.g.*, BLASTN (for nucleotide sequences) and BLASTP (for amino acid sequences) are described in McGinnis *et al.*, Nucleic Acids Res., 32: W20-W25 (2004).

[00155] In one embodiment of the invention, the aptamer has substantially the same ability to bind to IL-23 as that of an aptamer comprising any one of SEQ ID NOs 13-66, SEQ ID NOs 71-88, SEQ ID NOs 91-96, SEQ ID NOs 103-118, SEQ ID NOs 124-134, SEQ ID NOs 135-159, SEQ ID NO 162, and SEQ ID NOs 164-172, SEQ ID NOs 176-178, SEQ ID NOs 181-196, and SEQ ID NOs 199-314. In another embodiment of the invention, the aptamer has substantially the same structure and ability to bind to IL-23 as that of an aptamer comprising any one of SEQ ID NOs 13-66, SEQ ID NOs 71-88, SEQ ID NOs 91-96, SEQ ID NOs 103-118, SEQ ID NOs 124-134, SEQ ID NOs 135-159, SEQ ID NO 162, and SEQ ID NOs 164-172, SEQ ID NOs 176-178, SEQ ID NOs 181-196, and SEQ ID NOs 199-314.

[00156] In one embodiment of the invention, the aptamer has substantially the same ability to bind to IL-23 and/or IL-12 as that of an aptamer comprising any one of SEQ ID NO 14, SEQ ID NOs 17-19, SEQ ID NO 21, SEQ ID NOs 27-32, SEQ ID NOs 34-40, SEQ ID NO 42, SEQ ID NO 49, SEQ ID NOs 60-61, SEQ ID NOs 91-92, SEQ ID NO 94, and SEQ ID NOs 103-118. In another embodiment of the invention, the aptamer has substantially the same structure and ability to bind to IL-23 and/or IL-12 as that of an aptamer comprising any one of SEQ ID NO 14, SEQ ID NOs 17-19, SEQ ID NO 21, SEQ ID NOs 27-32, SEQ ID NOs 34-40, SEQ ID NO 42, SEQ ID NO 49, SEQ ID NOs 60-61, SEQ ID NOs 91-92, SEQ ID NO 94, and SEQ ID NOs 103-118.

[00157] In another embodiment, the aptamers of the invention are used as an active ingredient in pharmaceutical compositions. In another embodiment, the aptamers or compositions comprising the aptamers of the invention are used to treat inflammatory and autoimmune diseases (including but not limited to, multiple sclerosis, rheumatoid arthritis, psoriasis vulgaris, systemic lupus erythamatosus, and irritable bowel disease, including without limitation Crohn's disease, and ulcerative colitis), Type I Diabetes, colon cancer, lung cancer, and bone resorption in osteoporosis.

[00158] In some embodiments aptamer therapeutics of the present invention have great affinity and specificity to their targets while reducing the deleterious side effects from non-naturally occurring nucleotide substitutions if the aptamer therapeutics break down in the body of patients or subjects. In some embodiments, the therapeutic compositions containing the aptamer therapeutics of the present invention are free of or have a reduced amount of fluorinated nucleotides.

[00159] The aptamers of the present invention can be synthesized using any oligonucleotide synthesis techniques known in the art including solid phase oligonucleotide synthesis techniques (see, *e.g.*, Froehler *et al.*, Nucl. Acid Res. 14:5399-5467 (1986) and Froehler *et al.*, Tet. Lett. 27:5575-5578 (1986)) and solution phase methods well known in the art such as triester synthesis methods (see, e.g., Sood *et al.*, Nucl. Acid Res. 4:2557 (1977) and Hirose *et al.*, Tet. Lett., 28:2449 (1978)).

APTAMERS HAVING IMMUNOSTIMULATORY MOTIFS

[00160] The present invention provides aptamers that bind to IL-23 and/or IL-12 and modulate their biological function. More specifically, the present invention provides aptamers that increase the binding of IL-23 and/or IL-12 to the IL-23 and/or IL-12 receptor thereby enhancing the biological function of IL-23 and/or IL-12. The agonistic effect of such aptamers can be further enhanced by selecting for aptamers which bind to the IL-23 and/or IL-12 and contain immunostimulatory motifs, or by treating with aptamers which bind to IL-23 and/or IL-12 in conjunction with aptamers to a target known to bind immunostimulatory sequences.

[00161] Recognition of bacterial DNA by the vertebrate immune system is based on the recognition of unmethylated CG dinucleotides in particular sequence contexts ("CpG motifs"). One receptor that recognizes such a motif is Toll-like receptor 9 ("TLR 9"), a

member of a family of Toll-like receptors (~10 members) that participate in the innate immune response by recognizing distinct microbial components. TLR 9 binds unmethylated oligodeoxynucleotide ("ODN") CpG sequences in a sequence-specific manner. The recognition of CpG motifs triggers defense mechanisms leading to innate and ultimately acquired immune responses. For example, activation of TLR 9 in mice induces activation of antigen presenting cells, up regulation of MHC class I and II molecules and expression of important co-stimulatory molecules and cytokines including IL-12 and IL-23. This activation both directly and indirectly enhances B and T cell responses, including robust up regulation of the TH1 cytokine IFN-gamma. Collectively, the response to CpG sequences leads to: protection against infectious diseases, improved immune response to vaccines, an effective response against asthma, and improved antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. Thus, CpG ODNs can provide protection against infectious diseases, function as immuno-adjuvants or cancer therapeutics (monotherapy or in combination with a mAb or other therapies), and can decrease asthma and allergic response.

[00162] Aptamers of the present invention comprising one or more CpG or other immunostimulatory sequences can be identified or generated by a variety of strategies using, *e.g.*, the SELEX™ process described herein. The incorporated immunostimulatory sequences can be DNA, RNA and/or a combination DNA/RNA. In general the strategies can be divided into two groups. In group one, the strategies are directed to identifying or generating aptamers comprising both a CpG motif or other immunostimulatory sequence as well as a binding site for a target, where the target (hereinafter "non-CpG target") is a target other than one known to recognize CpG motifs or other immunostimulatory sequences and known to stimulates an immune response upon binding to a CpG motif. In some embodiments of the invention the non-CpG target is an IL-23 and/or IL12 target. The first strategy of this group comprises performing SELEX™ to obtain an aptamer to a specific non-CpG target, preferably a target, *e.g.*, IL-23 and/or IL-12, where a repressed immune response is relevant to disease development, using an oligonucleotide pool wherein a CpG motif has been incorporated into each member of the pool as, or as part of, a fixed region, *e.g.*, in some embodiments the randomized region of the pool members comprises a fixed region having a CpG motif incorporated therein, and identifying an aptamer comprising a CpG motif. The second strategy of this group comprises performing SELEX™ to obtain an aptamer to a specific non-CpG target preferably a target, *e.g.*, IL-23 and/or IL-12, where a repressed immune response is relevant to disease development, and following selection appending a CpG motif to the 5'

and/or 3' end or engineering a CpG motif into a region, preferably a non-essential region, of the aptamer. The third strategy of this group comprises performing SELEX™ to obtain an aptamer to a specific non-CpG target, preferably a target, *e.g.*, IL-23 and/or IL-12, where a repressed immune response is relevant to disease development, wherein during synthesis of the pool the molar ratio of the various nucleotides is biased in one or more nucleotide addition steps so that the randomized region of each member of the pool is enriched in CpG motifs, and identifying an aptamer comprising a CpG motif. The fourth strategy of this group comprises performing SELEX™ to obtain an aptamer to a specific non-CpG target, preferably a target, *e.g.*, IL-23 and/or IL-12, where a repressed immune response is relevant to disease development, and identifying an aptamer comprising a CpG motif. The fifth strategy of this group comprises performing SELEX™ to obtain an aptamer to a specific non-CpG target, preferably a target, *e.g.*, IL-23 and/or IL-12, where a repressed immune response is relevant to disease development, and identifying an aptamer which, upon binding, stimulates an immune response but which does not comprise a CpG motif.

[00163] In group two, the strategies are directed to identifying or generating aptamers comprising a CpG motif and/or other sequences that are bound by the receptors for the CpG motifs (*e.g.*, TLR9 or the other toll-like receptors) and upon binding stimulate an immune response. The first strategy of this group comprises performing SELEX™ to obtain an aptamer to a target known to bind to CpG motifs or other immunostimulatory sequences and upon binding stimulate an immune response using an oligonucleotide pool wherein a CpG motif has been incorporated into each member of the pool as, or as part of, a fixed region, *e.g.*, in some embodiments the randomized region of the pool members comprise a fixed region having a CpG motif incorporated therein, and identifying an aptamer comprising a CpG motif. The second strategy of this group comprises performing SELEX™ to obtain an aptamer to a target known to bind to CpG motifs or other immunostimulatory sequences and upon binding stimulate an immune response and then appending a CpG motif to the 5' and/or 3' end or engineering a CpG motif into a region, preferably a non-essential region, of the aptamer. The third strategy of this group comprises performing SELEX™ to obtain an aptamer to a target known to bind to CpG motifs or other immunostimulatory sequences and upon binding stimulate an immune response wherein during synthesis of the pool, the molar ratio of the various nucleotides is biased in one or more nucleotide addition steps so that the randomized region of each member of the pool is enriched in CpG motifs, and identifying an aptamer comprising a CpG motif. The fourth strategy of this group comprises performing

SELEX™ to obtain an aptamer to a target known to bind to CpG motifs or other immunostimulatory sequences and upon binding stimulate an immune response and identifying an aptamer comprising a CpG motif. The fifth strategy of this group comprises performing SELEX™ to obtain an aptamer to a target known to bind to CpG motifs or other immunostimulatory sequences, and identifying an aptamer which upon binding, stimulate an immune response but which does not comprise a CpG motif.

[00164] A variety of different classes of CpG motifs have been identified, each resulting upon recognition in a different cascade of events, release of cytokines and other molecules, and activation of certain cell types. *See, e.g.*, CpG Motifs in Bacterial DNA and Their Immune Effects, Annu. Rev. Immunol. 2002, 20:709-760, incorporated herein by reference. Additional immunostimulatory motifs are disclosed in the following U.S. Patents, each of which is incorporated herein by reference: U.S. Patent No. 6,207,646; U.S. Patent No. 6,239,116; U.S. Patent No. 6,429,199; U.S. Patent No. 6,214,806; U.S. Patent No. 6,653,292; U.S. Patent No. 6,426,434; U.S. Patent No. 6,514,948 and U.S. Patent No. 6,498,148. Any of these CpG or other immunostimulatory motifs can be incorporated into an aptamer. The choice of aptamers is dependent on the disease or disorder to be treated. Preferred immunostimulatory motifs are as follows (shown 5' to 3' left to right) wherein "r" designates a purine, "y" designates a pyrimidine, and "X" designates any nucleotide: AACGTTCGAG (SEQ ID NO 7); AACGTT; ACGT, rCGy; rrCGyy, XCGX, XXCGXX, and $X_1X_2CGY_1Y_2$ wherein X_1 is G or A, X_2 is not C, Y_1 is not G and Y_2 is preferably T.

[00165] In those instances where a CpG motif is incorporated into an aptamer that binds to a specific target other than a target known to bind to CpG motifs and upon binding stimulate an immune response (a "non-CpG target"), the CpG is preferably located in a non-essential region of the aptamer. Non-essential regions of aptamers can be identified by site-directed mutagenesis, deletion analyses and/or substitution analyses. However, any location that does not significantly interfere with the ability of the aptamer to bind to the non-CpG target may be used. In addition to being embedded within the aptamer sequence, the CpG motif may be appended to either or both of the 5' and 3' ends or otherwise attached to the aptamer. Any location or means of attachment may be used so long as the ability of the aptamer to bind to the non-CpG target is not significantly interfered with.

[00166] As used herein, "stimulation of an immune response" can mean either (1) the induction of a specific response (*e.g.*, induction of a Th1 response) or of the production of

52

certain molecules or (2) the inhibition or suppression of a specific response (e.g., inhibition or suppression of the Th2 response) or of certain molecules.

PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS

[00167] The invention also includes pharmaceutical compositions containing aptamer molecules that bind to IL-23 and/or IL-12. In some embodiments, the compositions are suitable for internal use and include an effective amount of a pharmacologically active compound of the invention, alone or in combination, with one or more pharmaceutically acceptable carriers. The compounds are especially useful in that they have very low, if any toxicity.

[00168] Compositions of the invention can be used to treat or prevent a pathology, such as a disease or disorder, or alleviate the symptoms of such disease or disorder in a patient. For example, compositions of the present invention can be used to treat or prevent a pathology associated with IL-23 and/or IL-12 cytokines, including inflammatory and autoimmune related diseases, Type I Diabetes, bone resorption in osteoporosis, and cancer.

[00169] Compositions of the invention are useful for administration to a subject suffering from, or predisposed to, a disease or disorder which is related to or derived from a target to which the aptamers of the invention specifically bind. Compositions of the invention can be used in a method for treating a patient or subject having a pathology. The method involves administering to the patient or subject an aptamer or a composition comprising aptamers that bind to IL-23 and/or IL-12 involved with the pathology, so that binding of the aptamer to the IL-23 and/or IL-12 alters the biological function of the target, thereby treating the pathology.

[00170] The patient or subject having a pathology, *i.e.*, the patient or subject treated by the methods of this invention, can be a vertebrate, more particularly a mammal, or more particularly a human.

[00171] In practice, the aptamers or their pharmaceutically acceptable salts, are administered in amounts which will be sufficient to exert their desired biological activity, e.g., inhibiting the binding of the IL-23 and/or IL-12 to its receptor.

[00172] One aspect of the invention comprises an aptamer composition of the invention in combination with other treatments for inflammatory and autoimmune diseases, cancer, and other related disorders. The aptamer composition of the invention may contain, for example, more than one aptamer. In some examples, an aptamer composition of the invention,

53 H

containing one or more compounds of the invention, is administered in combination with another useful composition such as an anti-inflammatory agent, an immunosuppressant, an antiviral agent, or the like. Furthermore, the compounds of the invention may be administered in combination with a cytotoxic, cytostatic, or chemotherapeutic agent such as an alkylating agent, anti-metabolite, mitotic inhibitor or cytotoxic antibiotic, as described above. In general, the currently available dosage forms of the known therapeutic agents for use in such combinations will be suitable.

[00173] "Combination therapy" (or "co-therapy") includes the administration of an aptamer composition of the invention and at least a second agent as part of a specific treatment regimen intended to provide the beneficial effect from the co-action of these therapeutic agents. The beneficial effect of the combination includes, but is not limited to, pharmacokinetic or pharmacodynamic co-action resulting from the combination of therapeutic agents. Administration of these therapeutic agents in combination typically is carried out over a defined time period (usually minutes, hours, days or weeks depending upon the combination selected).

[00174] "Combination therapy" may, but generally is not, intended to encompass the administration of two or more of these therapeutic agents as part of separate monotherapy regimens that incidentally and arbitrarily result in the combinations of the present invention. "Combination therapy" is intended to embrace administration of these therapeutic agents in a sequential manner, that is, wherein each therapeutic agent is administered at a different time, as well as administration of these therapeutic agents, or at least two of the therapeutic agents, in a substantially simultaneous manner. Substantially simultaneous administration can be accomplished, for example, by administering to the subject a single capsule having a fixed ratio of each therapeutic agent or in multiple, single capsules for each of the therapeutic agents.

[00175] Sequential or substantially simultaneous administration of each therapeutic agent can be effected by any appropriate route including, but not limited to, topical routes, oral routes, intravenous routes, intramuscular routes, and direct absorption through mucous membrane tissues. The therapeutic agents can be administered by the same route or by different routes. For example, a first therapeutic agent of the combination selected may be administered by injection while the other therapeutic agents of the combination may be administered topically.

54

[00176] Alternatively, for example, all therapeutic agents may be administered topically or all therapeutic agents may be administered by injection. The sequence in which the therapeutic agents are administered is not narrowly critical unless noted otherwise. "Combination therapy" also can embrace the administration of the therapeutic agents as described above in further combination with other biologically active ingredients. Where the combination therapy further comprises a non-drug treatment, the non-drug treatment may be conducted at any suitable time so long as a beneficial effect from the co-action of the combination of the therapeutic agents and non-drug treatment is achieved. For example, in appropriate cases, the beneficial effect is still achieved when the non-drug treatment is temporally removed from the administration of the therapeutic agents, perhaps by days or even weeks.

[00177] Therapeutic or pharmacological compositions of the present invention will generally comprise an effective amount of the active component(s) of the therapy, dissolved or dispersed in a pharmaceutically acceptable medium. Pharmaceutically acceptable media or carriers include any and all solvents, dispersion media, coatings, antibacterial and antifungal agents, isotonic and absorption delaying agents and the like. The use of such media and agents for pharmaceutical active substances is well known in the art. Supplementary active ingredients can also be incorporated into the therapeutic compositions of the present invention.

[00178] The preparation of pharmaceutical or pharmacological compositions will be known to those of skill in the art in light of the present disclosure. Typically, such compositions may be prepared as injectables, either as liquid solutions or suspensions; solid forms suitable for solution in, or suspension in, liquid prior to injection; as tablets or other solids for oral administration; as time release capsules; or in any other form currently used, including eye drops, creams, lotions, salves, inhalants and the like. The use of sterile formulations, such as saline-based washes, by surgeons, physicians or health care workers to treat a particular area in the operating field may also be particularly useful. Compositions may also be delivered via microdevice, microparticle or sponge.

[00179] Upon formulation, therapeutics will be administered in a manner compatible with the dosage formulation, and in such amount as is pharmacologically effective. The formulations are easily administered in a variety of dosage forms, such as the type of

injectable solutions described above, but drug release capsules and the like can also be employed.

[00180] In this context, the quantity of active ingredient and volume of composition to be administered depends on the host animal to be treated. Precise amounts of active compound required for *administration* depend on the judgment of the practitioner and are peculiar to each individual.

[00181] A minimal volume of a composition required to disperse the active compounds is typically utilized. Suitable regimes for administration are also variable, but would be typified by initially administering the compound and monitoring the results and then giving further controlled doses at further *intervals*.

[00182] For instance, for oral *administration* in the form of a tablet or capsule (*e.g.*, a gelatin capsule), the active drug component can be combined with an oral, non-toxic, pharmaceutically acceptable inert carrier such as ethanol, glycerol, water and the like. Moreover, when desired or necessary, suitable binders, lubricants, disintegrating agents, and coloring agents can also be incorporated into the mixture. *Suitable binders* include starch, magnesium aluminum silicate, starch paste, gelatin, methylcellulose, sodium carboxymethylcellulose and/or polyvinylpyrrolidone, natural sugars such as glucose or beta-lactose, corn sweeteners, natural and synthetic gums such as acacia, tragacanth or sodium alginate, polyethylene glycol, waxes, and the like. *Lubricants* used in these *dosage forms* include sodium oleate, sodium stearate, magnesium stearate, sodium benzoate, sodium acetate, sodium chloride, silica, talcum, stearic acid, its magnesium or calcium salt and/or polyethyleneglycol, and the like. Disintegrators include, without limitation, starch, methyl cellulose, agar, bentonite, xanthan gum starches, agar, alginic acid or its sodium salt, or effervescent mixtures, and the like. *Diluents*, include, *e.g.*, lactose, dextrose, sucrose, mannitol, sorbitol, cellulose and/or glycine.

[00183] The compounds of the invention can also be administered in such oral dosage forms as timed release and sustained release tablets or capsules, pills, powders, granules, elixirs, tinctures, suspensions, syrups and emulsions. Suppositories are advantageously prepared from fatty emulsions or suspensions.

[00184] The pharmaceutical compositions may be sterilized and/or contain *adjuvants*, such as preserving, stabilizing, wetting or emulsifying agents, solution promoters, salts for

regulating the osmotic pressure and/or buffers. In addition, they may also contain other therapeutically valuable substances. The compositions are prepared according to conventional mixing, granulating, or coating methods, and typically contain about 0.1% to 75%, preferably about 1% to 50%, of the active ingredient.

[00185] Liquid, particularly injectable compositions can, for example, be prepared by dissolving, dispersing, etc. The active compound is dissolved in or mixed with a pharmaceutically pure solvent such as, for example, water, saline, aqueous dextrose, glycerol, ethanol, and the like, to thereby form the injectable solution or suspension. Additionally, solid forms suitable for dissolving in liquid prior to injection can be formulated.

[00186] The compounds of the present invention can be administered in intravenous (both bolus and infusion), intraperitoneal, subcutaneous or intramuscular form, all using forms well known to those of ordinary skill in the pharmaceutical arts. Injectables can be prepared in conventional forms, either as liquid solutions or suspensions.

[00187] Parenteral injectable administration is generally used for subcutaneous, intramuscular or intravenous injections and infusions. Additionally, one approach for parenteral administration employs the implantation of a slow-release or sustained-released systems, which assures that a constant level of dosage is maintained, according to U.S. Pat. No. 3,710,795, incorporated herein by reference.

[00188] Furthermore, preferred compounds for the present invention can be administered in intranasal form via topical use of suitable intranasal vehicles, inhalants, or via transdermal routes, using those forms of transdermal skin patches well known to those of ordinary skill in that art. To be administered in the form of a transdermal delivery system, the dosage administration will, of course, be continuous rather than intermittent throughout the dosage regimen. Other preferred topical preparations include creams, ointments, lotions, aerosol sprays and gels, wherein the concentration of active ingredient would typically range from 0.01% to 15%, w/w or w/v.

[00189] For solid compositions, excipients include pharmaceutical grades of mannitol, lactose, starch, magnesium stearate, sodium saccharin, talcum, cellulose, glucose, sucrose, magnesium carbonate, and the like. The active compound defined above, may be also formulated as suppositories, using for example, polyalkylene glycols, for example, propylene

glycol, as the carrier. In some embodiments, suppositories are advantageously prepared from fatty emulsions or suspensions.

[00190] The compounds of the present invention can also be administered in the form of liposome delivery systems, such as small unilamellar vesicles, large unilamellar vesicles and multilamellar vesicles. Liposomes can be formed from a variety of phospholipids, containing cholesterol, stearylamine or phosphatidylcholines. In some embodiments, a film of lipid components is hydrated with an aqueous solution of drug to a form lipid layer encapsulating the drug, as described in U.S. Pat. No. 5,262,564. For example, the aptamer molecules described herein can be provided as a complex with a lipophilic compound or non-immunogenic, high molecular weight compound constructed using methods known in the art. An example of nucleic-acid associated complexes is provided in U.S. Patent No. 6,011,020.

[00191] The compounds of the present invention may also be coupled with soluble polymers as targetable drug carriers. Such polymers can include polyvinylpyrrolidone, pyran copolymer, polyhydroxypropyl-methacrylamide-phenol, polyhydroxyethylaspanamidephenol, or polyethyleneoxidepolylysine substituted with palmitoyl residues. Furthermore, the compounds of the present invention may be coupled to a class of biodegradable polymers useful in achieving controlled release of a drug, for example, polylactic acid, polyepsilon caprolactone, polyhydroxy butyric acid, polyorthoesters, polyacetals, polydihydropyrans, polycyanoacrylates and cross-linked or amphipathic block copolymers of hydrogels.

[00192] If desired, the pharmaceutical composition to be administered may also contain minor amounts of non-toxic auxiliary substances such as wetting or emulsifying agents, pH buffering agents, and other substances such as for example, sodium acetate, and triethanolamine oleate.

[00193] The dosage regimen utilizing the aptamers is selected in accordance with a variety of factors including type, species, age, weight, sex and medical condition of the patient; the severity of the condition to be treated; the route of administration; the renal and hepatic function of the patient; and the particular aptamer or salt thereof employed. An ordinarily skilled physician or veterinarian can readily determine and prescribe the effective amount of the drug required to prevent, counter or arrest the progress of the condition.

58

[00194] Oral dosages of the present invention, when used for the indicated effects, will range between about 0.05 to 7500 mg/day orally. The compositions are preferably provided in the form of scored tablets containing 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 10.0, 15.0, 25.0, 50.0, 100.0, 250.0, 500.0 and 1000.0 mg of active ingredient. Infused dosages, intranasal dosages and transdermal dosages will range between 0.05 to 7500 mg/day. Subcutaneous, intravenous and intraperitoneal dosages will range between 0.05 to 3800 mg/day.

[00195] Effective plasma levels of the compounds of the present invention range from 0.002 mg/mL to 50 mg/mL.

[00196] Compounds of the present invention may be administered in a single daily dose, or the total daily dosage may be administered in divided doses of two, three or four times daily.

MODULATION OF PHARMACOKINETICS AND BIODISTRIBUTION OF APTAMER THERAPEUTICS

[00197] It is important that the pharmacokinetic properties for all oligonucleotide-based therapeutics, including aptamers, be tailored to match the desired pharmaceutical application. While aptamers directed against extracellular targets do not suffer from difficulties associated with intracellular delivery (as is the case with antisense and RNAi-based therapeutics), such aptamers must still be able to be distributed to target organs and tissues, and remain in the body (unmodified) for a period of time consistent with the desired dosing regimen.

[00198] Thus, the present invention provides materials and methods to affect the pharmacokinetics of aptamer compositions, and, in particular, the ability to tune aptamer pharmacokinetics. The tunability of (*i.e.*, the ability to modulate) aptamer pharmacokinetics is achieved through conjugation of modifying moieties (*e.g.*, PEG polymers) to the aptamer and/or the incorporation of modified nucleotides (*e.g.*, 2'-fluoro or 2'-O-methyl) to alter the chemical composition of the nucleic acid. The ability to tune aptamer pharmacokinetics is used in the improvement of existing therapeutic applications, or alternatively, in the development of new therapeutic applications. For example, in some therapeutic applications, *e.g.*, in anti-neoplastic or acute care settings where rapid drug clearance or turn-off may be desired, it is desirable to decrease the residence times of aptamers in the circulation. Alternatively, in other therapeutic applications, *e.g.*, maintenance therapies where systemic

circulation of a therapeutic is desired, it may be desirable to increase the residence times of aptamers in circulation.

[00199] In addition, the tunability of aptamer pharmacokinetics is used to modify the biodistribution of an aptamer therapeutic in a subject. For example, in some therapeutic applications, it may be desirable to alter the biodistribution of an aptamer therapeutic in an effort to target a particular type of tissue or a specific organ (or set of organs). In these applications, the aptamer therapeutic preferentially accumulates in a specific tissue or organ(s). In other therapeutic applications, it may be desirable to target tissues displaying a cellular marker or a symptom associated with a given disease, cellular injury or other abnormal pathology, such that the aptamer therapeutic preferentially accumulates in the affected tissue. For example, as described in copending provisional application United States Serial No. 60/550790, filed on March 5, 2004, and entitled "Controlled Modulation of the Pharmacokinetics and Biodistribution of Aptamer Therapeutics", and in the non-provisional application United States Serial No. 10/—,—, filed on March 7, 2005, also entitled "Controlled Modulation of the Pharmacokinetics and Biodistribution of Aptamer Therapeutics", PEGylation of an aptamer therapeutic (*e.g.*, PEGylation with a 20 kDa PEG polymer) is used to target inflamed tissues, such that the PEGylated aptamer therapeutic preferentially accumulates in inflamed tissue.

[00200] To determine the pharmacokinetic and biodistribution profiles of aptamer therapeutics (*e.g.*, aptamer conjugates or aptamers having altered chemistries, such as modified nucleotides) a variety of parameters are monitored. Such parameters include, for example, the half-life ($t_{1/2}$), the plasma clearance (Cl), the volume of distribution (Vss), the area under the concentration-time curve (AUC), maximum observed serum or plasma concentration (C_{max}), and the mean residence time (MRT) of an aptamer composition. As used herein, the term "AUC" refers to the area under the plot of the plasma concentration of an aptamer therapeutic versus the time after aptamer administration. The AUC value is used to estimate the bioavailability (*i.e.*, the percentage of administered aptamer therapeutic in the circulation after aptamer administration) and/or total clearance (Cl) (*i.e.*, the rate at which the aptamer therapeutic is removed from circulation) of a given aptamer therapeutic. The volume of distribution relates the plasma concentration of an aptamer therapeutic to the amount of aptamer present in the body. The larger the Vss, the more an aptamer is found outside of the plasma (*i.e.*, the more extravasation).

[00201] The present invention provides materials and methods to modulate, in a controlled manner, the pharmacokinetics and biodistribution of stabilized aptamer compositions *in vivo* by conjugating an aptamer to a modulating moiety such as a small molecule, peptide, or polymer terminal group, or by incorporating modified nucleotides into an aptamer. As described herein, conjugation of a modifying moiety and/or altering nucleotide(s) chemical composition alters fundamental aspects of aptamer residence time in circulation and distribution to tissues.

[00202] In addition to clearance by nucleases, oligonucleotide therapeutics are subject to elimination *via* renal filtration. As such, a nuclease-resistant oligonucleotide administered intravenously typically exhibits an *in vivo* half-life of <10 min, unless filtration can be blocked. This can be accomplished by either facilitating rapid distribution out of the blood stream into tissues or by increasing the apparent molecular weight of the oligonucleotide above the effective size cut-off for the glomerulus. Conjugation of small therapeutics to a *PEG polymer (PEGylation)*, described below, can dramatically lengthen residence times of aptamers in circulation, thereby decreasing dosing frequency and enhancing effectiveness against vascular targets.

[00203] Aptamers can be conjugated to a variety of modifying moieties, such as high molecular weight polymers, *e.g.*, PEG; peptides, *e.g.*, Tat (a 13-amino acid fragment of the HIV Tat protein (Vives, *et al.*, (1997), J. Biol. Chem. 272(25): 16010-7)), Ant (a 16-amino acid sequence derived from the third helix of the Drosophila antennapedia homeotic protein (Pietersz, *et al.*, (2001), Vaccine 19(11-12): 1397-405)) and Arg_7 (a short, positively charged cell-permeating peptides composed of polyarginine (Arg_7) (Rothbard, *et al.*, (2000), Nat. Med. 6(11): 1253-7; Rothbard, J *et al.*, (2002), J. Med. Chem. 45(17): 3612-8)); and small molecules, *e.g.*, lipophilic compounds such as cholesterol. Among the various conjugates described herein, *in vivo* properties of aptamers are altered most profoundly by complexation with PEG groups. For example, complexation of a mixed 2'F and 2'-OMe modified aptamer therapeutic with a 20 kDa PEG polymer hinders renal filtration and promotes aptamer distribution to both healthy and inflamed tissues. Furthermore, the 20 kDa PEG polymer-aptamer conjugate proves nearly as effective as a 40 kDa PEG polymer in preventing renal filtration of aptamers. While one effect of PEGylation is on aptamer clearance, the prolonged systemic exposure afforded by presence of the 20 kDa moiety also facilitates distribution of aptamer to tissues, particularly those of highly perfused organs and those at the site of

61

inflammation. The aptamer-20 kDa PEG polymer conjugate directs aptamer distribution to the site of inflammation, such that the PEGylated aptamer preferentially accumulates in inflamed tissue. In some instances, the 20 kDa PEGylated aptamer conjugate is able to access the interior of cells, such as, for example, kidney cells.

[00204] Modified nucleotides can also be used to modulate the plasma clearance of aptamers. For example, an unconjugated aptamer which incorporates both 2'-F and 2'-OMe stabilizing chemistries, which is typical of current generation aptamers as it exhibits a high degree of nuclease stability *in vitro* and *in vivo*, displays rapid loss from plasma (*i.e.*, rapid plasma clearance) and a rapid distribution into tissues, primarily into the kidney, when compared to unmodified aptamer.

PEG-DERIVATIZED NUCLEIC ACIDS

[00205] As described above, derivatization of nucleic acids with high molecular weight non-immunogenic polymers has the potential to alter the pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of nucleic acids making them more effective therapeutic agents. Favorable changes in activity can include increased resistance to degradation by nucleases, decreased filtration through the kidneys, decreased exposure to the immune system, and altered distribution of the therapeutic through the body.

[00206] The aptamer compositions of the invention may be derivatized with polyalkylene glycol ("PAG") moieties. Examples of PAG-derivatized nucleic acids are found in United States Patent Application Ser. No. 10/718,833, filed on November 21, 2003, which is herein incorporated by reference in its entirety. Typical polymers used in the invention include polyethylene glycol ("PEG"), also known as polyethylene oxide ("PEO") and polypropylene glycol (including poly isopropylene glycol). Additionally, random or block copolymers of different alkylene oxides (*e.g.*, ethylene oxide and propylene oxide) can be used in many applications. In its most common form, a polyalkylene glycol, such as PEG, is a linear polymer terminated at each end with hydroxyl groups: $HO\text{-}CH_2CH_2O\text{-}(CH_2CH_2O)_n\text{-}CH_2CH_2\text{-}OH$. This polymer, alpha-, omega-dihydroxylpolyethylene glycol, can also be represented as HO-PEG-OH, where it is understood that the —PEG- symbol represents the following structural unit: $\text{-}CH_2CH_2O\text{-}(CH_2CH_2O)_n\text{-}CH_2CH_2\text{-}$ where n typically ranges from about 4 to about 10,000.

[00207] As shown, the PEG molecule is di-functional and is sometimes referred to as "PEG diol." The terminal portions of the PEG molecule are relatively non-reactive hydroxyl moieties, the –OH groups, that can be activated, or converted to functional moieties, for attachment of the PEG to other compounds at reactive sites on the compound. Such activated PEG diols are referred to herein as bi-activated PEGs. For example, the terminal moieties of PEG diol have been functionalized as active carbonate ester for selective reaction with amino moieties by substitution of the relatively non-reactive hydroxyl moieties, -OH, with succinimidyl active ester moieties from N-hydroxy succinimide.

[00208] In many applications, it is desirable to cap the PEG molecule on one end with an essentially non-reactive moiety so that the PEG molecule is mono-functional (or mono-activated). In the case of protein therapeutics which generally display multiple reaction sites for activated PEGs, bi-functional activated PEGs lead to extensive cross-linking, yielding poorly functional aggregates. To generate mono-activated PEGs, one hydroxyl moiety on the terminus of the PEG diol molecule typically is substituted with non-reactive methoxy end moiety, $-OCH_3$. The other, un-capped terminus of the PEG molecule typically is converted to a reactive end moiety that can be activated for attachment at a reactive site on a surface or a molecule such as a protein.

[00209] PAGs are polymers which typically have the properties of solubility in water and in many organic solvents, lack of toxicity, and lack of immunogenicity. One use of PAGs is to covalently attach the polymer to insoluble molecules to make the resulting PAG-molecule "conjugate" soluble. For example, it has been shown that the water-insoluble drug paclitaxel, when coupled to PEG, becomes water-soluble. Greenwald, *et al., J. Org. Chem.*, 60:331-336 (1995). PAG conjugates are often used not only to enhance solubility and stability but also to prolong the blood circulation half-life of molecules.

[00210] Polyalkylated compounds of the invention are typically between 5 and 80 kDa in size however any size can be used, the choice dependent on the aptamer and application. Other PAG compounds of the invention are between 10 and 80 kDa in size. Still other PAG compounds of the invention are between 10 and 60 kDa in size. For example, a PAG polymer may be at least 10, 20, 30, 40, 50, 60, or 80 kDa in size. Such polymers can be linear or branched. In some embodiments the polymers are PEG. In some embodiment the polymers are branched PEG. In still other embodiments the polymers are 40kDa branched

PEG as depicted in Figure 4. In some embodiments the 40 kDa branched PEG is attached to the 5' end of the aptamer as depicted in Figure 5.

[00211] In contrast to biologically-expressed protein therapeutics, nucleic acid therapeutics are typically chemically synthesized from activated monomer nucleotides. PEG-nucleic acid conjugates may be prepared by incorporating the PEG using the same iterative monomer synthesis. For example, PEGs activated by conversion to a phosphoramidite form can be incorporated into solid-phase oligonucleotide synthesis. Alternatively, oligonucleotide synthesis can be completed with site-specific incorporation of a reactive PEG attachment site. Most commonly this has been accomplished by addition of a free primary amine at the 5'-terminus (incorporated using a modifier phosphoramidite in the last coupling step of solid phase synthesis). Using this approach, a reactive PEG (*e.g.*, one which is activated so that it will react and form a bond with an amine) is combined with the purified oligonucleotide and the coupling reaction is carried out in solution.

[00212] The ability of PEG conjugation to alter the biodistribution of a therapeutic is related to a number of factors including the apparent size (*e.g.*, as measured in terms of hydrodynamic radius) of the conjugate. Larger conjugates (>10 kDa) are known to more effectively block filtration via the kidney and to consequently increase the serum half-life of small macromolecules (*e.g.*, peptides, antisense oligonucleotides). The ability of PEG conjugates to block filtration has been shown to increase with PEG size up to approximately 50 kDa (further increases have minimal beneficial effect as half life becomes defined by macrophage-mediated metabolism rather than elimination via the kidneys).

[00213] Production of high molecular weight PEGs (>10 kDa) can be difficult, inefficient, and expensive. As a route towards the synthesis of high molecular weight PEG-nucleic acid conjugates, previous work has been focused towards the generation of higher molecular weight activated PEGs. One method for generating such molecules involves the formation of a branched activated PEG in which two or more PEGs are attached to a central core carrying the activated group. The terminal portions of these higher molecular weight PEG molecules, *i.e.*, the relatively non-reactive hydroxyl (–OH) moieties, can be activated, or converted to functional moieties, for attachment of one or more of the PEGs to other compounds at reactive sites on the compound. Branched activated PEGs will have more than two termini, and in cases where two or more termini have been activated, such activated higher molecular weight PEG molecules are referred to herein as, multi-activated PEGs. In some cases, not all

termini in a branch PEG molecule are activated. In cases where any two termini of a branch PEG molecule are activated, such PEG molecules are referred to as bi-activated PEGs. In some cases where only one terminus in a branch PEG molecule is activated, such PEG molecules are referred to as mono-activated. As an example of this approach, activated PEG prepared by the attachment of two monomethoxy PEGs to a lysine core which is subsequently activated for reaction has been described (Harris *et al.*, Nature, vol.2: 214-221, 2003).

[00214] The present invention provides another cost effective route to the synthesis of high molecular weight PEG-nucleic acid (preferably, aptamer) conjugates including multiply PEGylated nucleic acids. The present invention also encompasses PEG-linked multimeric oligonucleotides, *e.g.*, dimerized aptamers. The present invention also relates to high molecular weight compositions where a PEG stabilizing moiety is a linker which separates diffbrent portions of an aptamer, *e.g.*, the PEG is conjugated within a single aptamer sequence, such that the linear arrangement of the high molecular weight aptamer composition is, *e.g.*, nucleic acid – PEG – nucleic acid (– PEG — nucleic acid)$_n$ where n is greater than or equal to 1.

[00215] High molecular weight compositions of the invention include those having a molecular weight of at least 10 kDa. Compositions typically have a molecular weight between 10 and 80 kDa in size. High molecular weight compositions of the invention are at least 10, 20, 30, 40, 50, 60, or 80 kDa in size.

[00216] A stabilizing moiety is a molecule, or portion of a molecule, which improves pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of the high molecular weight aptamer compositions of the invention. In some cases, a stabilizing moiety is a molecule or portion of a molecule which brings two or more aptamers, or aptamer domains, into proximity, or provides decreased overall rotational freedom of the high molecular weight aptamer compositions of the invention. A stabilizing moiety can be a polyalkylene glycol, such a polyethylene glycol, which can be linear or branched, a homopolymer or a heteropolymer. Other stabilizing moieties include polymers such as peptide nucleic acids (PNA). Oligonucleotides can also be stabilizing moieties; such oligonucleotides can include modified nucleotides, and/or modified linkages, such as phosphorothioates. A stabilizing moiety can be an integral part of an aptamer composition, *i.e.*, it is covalently bonded to the aptamer.

[00217] Compositions of the invention include high molecular weight aptamer compositions in which two or more nucleic acid moieties are covalently conjugated to at least one polyalkylene glycol *moiety*. The polyalkylene glycol moieties serve as stabilizing moieties. In compositions where a polyalkylene glycol moiety is covalently bound at either end to an aptamer, such that the polyalkylene glycol joins the nucleic acid moieties together in one molecule, the polyalkylene glycol is said to be a linking moiety. In such compositions, the primary structure of the covalent molecule includes the linear arrangement nucleic acid-PAG-nucleic acid. One example is a composition having the primary structure nucleic acid-PEG-nucleic acid. Another example is a linear arrangement of: nucleic acid – PEG – nucleic acid – PEG — nucleic acid.

[00218] To produce the nucleic acid—PEG—nucleic acid conjugate, the nucleic acid is originally synthesized such that it bears a single reactive site (*e.g.*, it is mono-activated). In a preferred embodiment, this reactive site is an amino group introduced at the 5'-terminus by addition of a modifier phosphoramidite as the last step in solid phase synthesis of the oligonucleotide. Following deprotection and purification of the modified oligonucleotide, it is reconstituted at high concentration in a solution that minimizes spontaneous hydrolysis of the activated PEG. In a preferred embodiment, the concentration of oligonucleotide is 1 mM and the reconstituted solution contains 200 mM $NaHCO_3$-buffer, pH 8.3. Synthesis of the conjugate is initiated by slow, step-wise addition of highly purified bi-functional PEG. In a preferred embodiment, the PEG diol is activated at both ends (bi-activated) by derivatization with succinimidyl propionate. Following reaction, the PEG-nucleic acid conjugate is purified by gel electrophoresis or liquid chromatography to separate fully-, partially-, and un-conjugated species. Multiple PAG molecules concatenated (*e.g.*, as random or block copolymers) or smaller PAG chains can be linked to achieve various lengths (or molecular weights). Non-PAG linkers can be used between PAG chains of varying lengths.

[00219] The 2'-O-methyl, 2'-fluoro and other modified nucleotide modifications stabilize the aptamer *against* nucleases and increase its half life *in vivo*. The 3'-3'-dT cap also increases exonuclease resistance. See, *e.g.*, U.S. Patents 5,674,685; 5,668,264; 6,207,816; and 6,229,002, each of which is incorporated by reference herein in its entirety.

PAG-DERIVATIZATION OF A REACTIVE NUCLEIC ACID

[00220] High molecular weight PAG-nucleic acid-PAG conjugates can be prepared by reaction of a mono-functional activated PEG with a nucleic acid containing more than one

reactive site. In one embodiment, the nucleic acid is bi-reactive, or bi-activated, and contains two reactive sites: a 5'-amino group and a 3'-amino group introduced into the oligonucleotide through conventional phosphoramidite synthesis, for example: 3'-5'-di-PEGylation as illustrated in Figure 6. In alternative embodiments, reactive sites can be introduced at internal positions, using for example, the 5-position of pyrimidines, the 8-position of purines, or the 2'-position of ribose as sites for attachment of primary amines. In such embodiments, the nucleic acid can have several activated or reactive sites and is said to be multiply activated. Following synthesis and purification, the modified oligonucleotide is combined with the mono-activated PEG under conditions that promote selective reaction with the oligonucleotide reactive sites while minimizing spontaneous hydrolysis. In the preferred embodiment, monomethoxy-PEG is activated with succinimidyl propionate and the coupled reaction is carried out at pH 8.3. To drive synthesis of the bi-substituted PEG, stoichiometric excess PEG is provided relative to the oligonucleotide. Following reaction, the PEG-nucleic acid conjugate is purified by gel electrophoresis or liquid chromatography to separate fully, partially, and un-conjugated species.

[00221] The linking domains can also have one or more polyalkylene glycol moieties attached thereto. Such PAGs can be of varying lengths and may be used in appropriate combinations to achieve the desired molecular weight of the composition.

[00222] The effect of a particular linker can be influenced by both its chemical composition and length. A linker that is too long, too short, or forms unfavorable steric and/or ionic interactions with the IL-23 and/or IL-12 will preclude the formation of complex between the aptamer and IL-23 and/or IL-12. A linker, which is longer than necessary to span the distance between nucleic acids, may reduce binding stability by diminishing the effective concentration of the ligand. Thus, it is often necessary to optimize linker compositions and lengths in order to maximize the affinity of an aptamer to a target.

[00223] All publications and patent documents cited herein are incorporated herein by reference as if each such publication or document was specifically and individually indicated to be incorporated herein by reference. Citation of publications and patent documents is not intended as an admission that any is pertinent prior art, nor does it constitute any admission as to the contents or date of the same. The invention having now been described by way of written description, those of skill in the art will recognize that the invention can be practiced

in a variety of embodiments and that the foregoing description and examples below are for purposes of illustration and not limitation of the claims that follow.

EXAMPLES

EXAMPLE 1: APTAMER SELECTION AND SEQUENCES

IL-23 Aptamer Selection

[00224] Several SELEX™ strategies were employed to generate ligands with a variety of specificities for IL-23 and IL-12. One scheme, designed to produce aptamers specific for IL-23 vs. IL-12, included IL-12 in a negative selection step to eliminate aptamers that recognize the common subunit and select for aptamers specific to IL-23. A separate SELEX™ scheme in which IL-23 and IL-12 were alternated every other round elicited aptamers that recognized the common subunit and therefore recognized both proteins. In Examples 1A and 1E, selections were done with 2'-OH purine and 2'-F pyrimidine (rRfY) containing pools. Clones from these selections were optimized based on their binding affinity and efficacy in blocking IL-23 activity in a cell based assay. In addition, selections with 2'-OMe nucleotide containing pools, *i.e.*, rRmY (2'-OH A and G, and 2'-OMe C and U), rGmH (2'-OH G and 2'-OMe C, U, A), and dRmY (deoxy A and G, and 2'-OMe C and U) are described in Examples 1B, 1C, and 1D below.

EXAMPLE 1A: Selections against human IL-23 with 2'-Fluoro pyrimidines containing pools (rRfY)

[00225] Three selections were performed to identify aptamers to human ("h")-IL-23 using a pool consisting of 2'-OH purine (ribo-purines) and 2'-F pyrimidine nucleotides (rRfY conditions). The first selection (h-IL-23) was a direct selection against h-IL-23, which is comprised of p19 and p40 domains. The second selection (X-IL-23) utilized h-IL-23 and h-IL-12 in alternating rounds to drive selection of aptamers to the common subunit between the two proteins, p40. In the third selection (PN-IL-23), h-IL-12 was included in the negative selection step to drive enrichment of aptamers binding to the subdomain unique to h-IL-23, p19. As described below, the starting material for this third selection, *i.e.*, the PN-IL-23

selection was a portion of the pool from the h-IL-23 selection, separated from the remainder of the h-IL-23 pool after two rounds of selection against h-IL-23 protein. All three selection strategies yielded aptamers to h-IL-23. Several aptamers are highly specific for h-IL-23, several show cross reactivity between h-IL-23 and h-IL-12, and one is more specific for h-IL-12 vs. h-IL-23.

[00226] Round 1 of the h-IL-23 and the PN-IL-23 selection began with incubation of $2x10^{14}$ molecules of 2'F pyrimidine modified ARC 212 pool (SEQ ID NO 8) (5'gggaaaagcgaaucauscacaaga-N40-gcuccgccagagaccaaccgagaa3'), including a spike of $\alpha^{32}P$ ATP body labeled pool, with 100 pmoles of IL-23 protein (R&D, Minneapolis, MN) in a final volume of 100 µL for 1hr at room temperature. The series of N's in the template (SEQ ID NO 8) can be any combination of nucleotides and gives rise to the unique sequence region of the resulting aptamers.

[00227] After Round 2, the pool was divided into two equal portions, one portion was used for subsequent rounds (*i.e.*, Rounds 3-12) of the h-IL-23 selection and the other portion was used for the subsequent rounds (*i.e.*, Rounds 3-11) of the PN-IL-23 selection. Round 1 of the X-IL-23 selection was conducted similarly, except the pool RNA was incubated with 50 pmoles of h-IL-23 and 50 pmoles of h-IL-12.

[00228] All selections were performed in 1X SHMCK buffer, pH 7.4 (20 mM Hepes pH 7.4, 120 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM $MgCl_2$, 1 mM $CaCl_2$). RNA:h-IL-23 complexes and free RNA molecules were separated using 0.45 µm nitrocellulose spin columns from Schleicher & Schuell (Keene, NH). The columns were pre-washed with 1 mL 1X SHMCK, and then the RNA:protein containing solutions were added to the columns and spun in a centrifuge at 1500 g for 2 minutes. Buffer washes were performed to remove nonspecific binders from the filters (Round 1, 2 x 500 µL 1X SHMCK; in later rounds, more stringent washes of increased number and volume to enrich for specific binders), then the RNA:protein complexes attached to the filters were eluted with 2 x 200 µL washes (2 x 100 µL washes in later rounds) of elution buffer (7 M urea, 100 mM sodium acetate, 3 mM EDTA, pre-heated to 95°C). The eluted RNA was phenol:chloroform extracted, then precipitated (40 µg glycogen, 1 volume isopropanol). The RNA was reverse transcribed with the Thermoscript™ RT-PCR system (Invitrogen, Carlsbad, CA) according to the manufacturer's instructions, using the 3' primer 5'ttctcggttggtctctggcggagc 3' (SEQ ID NO 10), followed by amplification by PCR (20 mM Tris pH 8.4, 50 mM KCl, 2 mM $MgCl_2$, 0.5 µM of 5' primer

5'taatacgactcactatagggaaagcgaatcatacacaaga 3' (SEQ ID NO 9), 0.5 μM of 3' primer (SEQ ID NO 10), 0.5 mM each dNTP, 0.05 units/μL Taq polymerase (New England Biolabs, Beverly, MA)). PCR reactions were done under the following cycling conditions: a) 94°C for 30 seconds; b) 55°C for 30 seconds; c) 72°C for 30 seconds. The cycles were repeated until sufficient PCR product was generated. The minimum number of cycles required to generate sufficient PCR product is reported in Tables 1-3 below as the "PCR Threshold".

[00229] The PCR templates were purified using the QIAquick PCR purification kit (Qiagen, Valencia, CA). Templates were transcribed using α^{32}P ATP body labeling overnight at 37°C (4% PEG-8000, 40 mM Tris pH 8.0, 12 mM $MgCl_2$, 1 mM spermidine, 0.002 % Triton X-100, 3 mM 2'OH purines, 3 mM 2'F pyrimidines, 25 mM DTT, 0.0025 units/μL inorganic pyrophosphatase, 2 μg/mL T7 Y639F single mutant RNA polymerase, 5 μCi α^{32}P ATP). The reactions were desalted using Bio Spin columns (Bio-Rad, Hercules, CA) according to the manufacturer's instructions.

[00230] Subsequent rounds of all three selections were repeated using the same method as for Round 1, except for the changes indicated in Tables 1-3. Prior to incubation with protein target, the pool RNA was passed through a 0.45 micron nitrocellulose filter column to remove filter binding sequences, then the filtrate was carried on into the positive selection step. In alternating rounds the pool RNA was gel purified. Transcription reactions were quenched with 50 mM EDTA and ethanol precipitated then purified on a 1.5 mm denaturing polyacrylamide gel (8 M urea, 10% acrylamide; 19:1 acrylamide:bisacrylamide). Pool RNA was removed from the gel by electroelution in an Elutrap® apparatus (Schleicher and Schuell, Keene, NH) at 225V for 1 hour in 1X TBE (90 mM Tris, 90 mM boric acid, 0.2 mM EDTA). The eluted material was precipitated by the addition of 300 mM sodium acetate and 2.5 volumes of ethanol.

[00231] The RNA remained in excess of the protein throughout the selections (~1-2 μM RNA). The protein concentration was 1 μM for the first 2 rounds, and then was dropped to varying lower concentrations based on the particular selection. Competitor tRNA was added to the binding reactions at 0.1 mg/mL starting at Round 3 or 4, depending on the selection. A total of 11-12 rounds were completed, with binding assays performed at select rounds. Tables 1-3 below contains the selection details used for the tRfY selections using the h-IL-23, X-IL-23, and PN-IL-23 selection strategies; including pool RNA concentration, protein concentration, and tRNA concentration used for each round. Elution values (ratio of CPM

values of protein-bound RNA versus total RNA flowing through the filter column) along with dot blot binding assays were used to monitor selection progress.

[00232] Table 1. Conditions used for h-IL-23 Selection

Round #	RNA pool conc (μM)	protein type	protein conc (μM)	tRNA conc (mg/mL)	neg	%elution	PCR Threshold
1	3.3	IL-23	1	0	none	4.38	10
2	~1	IL-23	1	0	NC	0.85	10
3	0.8	IL-23	0.75	0	NC	10.9	8
4	~1	IL-23	0.5	0.1	NC	0.53	8
5	1	IL-23	0.1	0.1	NC	1.72	11
6	~1	IL-23	0.1	0.1	NC	0.11	12
7	1	IL-23	0.1	0.1	NC	1.15	8
8	~0.5	IL-23	0.05	0.1	NC	0.12	11
9	0.5	IL-23	0.05	0.1	NC	3.54	8
10	~0.5	IL-23	0.05	0.1	NC	0.18	12
11	0.5	IL-23	0.025	0.1	NC	1.09	12
12	~0.5	IL-23	0.025	0.1	NC	0.07	12

[00233] Table 2. Conditions used for X-IL-23 Selection

Round #	RNA pool conc (μM)	protein type	protein conc (μM)	tRNA conc (mg/mL)	neg	%elution	PCR Threshold
1	3.3	IL-23/ IL-12	0.5 each	0	none	3.15	10
2	~1	IL-23/ IL-12	0.5 each	0	NC	0.56	10
3	0.8	IL-12	0.75	0	NC	0.58	13
4	~1	IL-23	0.75	0.1	NC	0.37	8
5	1	IL-12	0.5	0.1	NC	0.38	11
6	~1	IL-23	0.1	0.1	NC	0.08	12
7	1	IL-12	0.1	0.1	NC	0.50	9
8	~0.5	IL-23	0.05	0.1	NC	0.10	11

9	0.5	IL-12	0.05	0.1	NC	0.83	11
10	~0.5	IL-23	0.05	0.1	NC	0.17	8
11	0.5	IL-12	0.025	0.1	NC	0.91	12
12	~0.5	IL-23	0.025	0.1	NC	0.05	12

[00234] Table 3. Conditions used for PN-IL-23

Round #	RNA pool conc (μM)	protein type	protein conc (μM)	tRNA conc (mg/mL)	neg	neg IL-12 conc (μM)	%elution	PCR Threshold
1	3.3	IL-23	1	0	none	0	4.38	10
2	~1	IL-23	1	0	NC	0	0.85	10
3	0.8	IL-23	0.75	0.1	NC/IL-12	0.75	1.15	10
4	~1	IL-23	0.75	0.1	NC/IL-12	0.75	0.59	10
5	0.7	IL-23	0.5	0.1	NC/IL-12	0.5	4.19	10
6	~1	IL-23	0.1	0.1	NC/IL-12	0.5	0.05	14
7	1	IL-23	0.1	0.1	NC/IL-12	0.5	0.38	10
8	~1	IL-23	0.1	0.1	NC/IL-12	0.3	0.18	15
9	1	IL-23	0.1	0.1	NC/IL-12	0.5	2.81	8
10	~1	IL-23	0.05	0.1	NC/IL-12	0.5	0.21	10
11	~1	IL-23	0.05	0.1	NC/IL-12	0.5	1.35	12

[00235] Monitoring Progress of rRfY Selection. Dot blot binding assays were performed throughout the selections to monitor the protein binding affinity of the pools. Trace ^{32}P-labeled RNA was combined with a dilution series of h-IL-23 and incubated at room temperature for 30 minutes in 1X SHMCK (20 mM Hepes, 120 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM $MgCl_2$, 1 mM $CaCl_2$, pH 7.4) plus 0.1 mg/mL tRNA for a final volume of 20 μL. The binding reactions were analyzed by nitrocellulose filtration using a Minifold I dot-blot, 96-well vacuum filtration manifold (Schleicher & Schuell, Keene, NH). A three-layer filtration medium was used, consisting (from top to bottom) of Protran nitrocellulose (Schleicher & Schuell), Hybond-P nylon (Amersham Biosciences) and GB002 gel blot paper (Schleicher & Schuell). RNA that is bound to protein is captured on the nitrocellulose filter, whereas the non-protein bound RNA is captured on the nylon filter. The gel blot paper was included

simply as a supporting medium for the other filters. Following filtration, the filter layers were separated, dried and exposed on a phosphor screen (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) and quantified using a Storm 860 PhosphorImager® blot imaging system (Amersham Biosciences).

[00236] When a significant positive ratio of binding of RNA in the presence of h-IL-23 versus in the absence of h-IL-23 was seen, the pools were cloned using a TOPO TA cloning kit (Invitrogen, Carlsbad, CA) according to the manufacturer's instructions. For the h-IL-23 and X-IL-23 selections, the Round 8 pool templates were cloned, and 32 individual clones from each selection were assayed in a 1-point dot blot screen (+/- 75 nM h-IL-23, as well as a separate screen at +/- 75 nM h-IL-12). For the FN-IL-23 selection, the Round 10 pool was cloned and sequenced, and 8 unique clones were assayed for protein binding in a 1-point dot blot screen (+/- 200 nM h-IL-23 and a separate screen at +/- 200nM h-IL-12). Subsequently, the Round 10 FN-IL-23 pool was re-cloned for further sequences, as well as the R12 FN-IL-23 pool, and the clones were assayed for protein binding in a 1 point do blot screen (+/- 100 nM h-IL-23 or +/- 200 nM h-IL-12). For K_D determination, the clone transcripts were 5'end labeled with γ^{-32}P ATP. K_D values were determined using a dilution series of h-IL-23 (R&D Systems, Minneapolis, MN) in the dot blot assay for all unique sequences with good +/- h-IL-23 binding ratios in the initial screens, and fitting an equation describing a 1:1 RNA:protein complex to the resulting data (fraction aptamer bound = amplitude*([IL-23]/(K_D + [IL-23])) (KaleidaGraph v. 3.51, Synergy Software). Results of protein binding characterization are tabulated in Table 4. Clones with high affinity to h-IL-23 were prepped and screened for functionality in cell-based assays, described in Example 3 below.

[00237] Table 4. zRfY Clone binding activity (all measurements were made in the presence of 0.1 mg/mL tRNA)

Round 8 h-IL-23					1-pt Screen Data	
SEQ ID NO	Clone Name	K_D IL-23 (nM)	K_D IL-12 (nM)	K_D IL-12/K_D IL-23	+/-IL-23 75 nM	+/-IL-12 75 nM
15	AMX86-B5	195.5	N.B.		5.79	1.01
27	AMX86-C5	80.3	399.8	4.98	6.23	2.65
13	AMX86-D5	27.4	N.B.		7.17	1.52
16	AMX86-D6	25	N.B.		9.82	1.43
24	AMX86-E6	51.3	N.B.		9.02	1.13

22	AMX86-F6	69.1	N.B.		10.17	1.36
18	AMX86-A7	57.7	667.9	11.58	3.99	1.59
14	AMX86-B7	111	934.1	8.42	7.81	1.46
20	AMX86-C7	140.3	N.B.		4.65	0.77
19	AMX86-E7	210.2	267.5	1.27	6.79	1.23
21	AMX86-F7	147	106.4	0.72	13.07	2.49
25	AMX86-H7	89.8	N.B.		10.85	1.26
26	AMX86-C8	107.1	N.B.		5.28	1.17
23	AMX86-D8	294.2	N.B.		6.87	1.08
17	AMX86-G8	133.7	2493.1	18.65	7.26	2.05

Round 8 X-IL-23					1-pt Screen Data	
SEQ ID NO	Clone Name	IL-23 K_D (nM)	IL-12 K_D (nM)	K_D IL-12/K_D IL-23	+/-IL-23 75 nM	+/-IL-12 75 nM
41	AMX86-A9	190.5	N.B.		3.55	0.68
35	AMX86-B9	23.7	847.6	35.76	12.88	1.96
32	AMX86-C9	97.9	672.8	6.87	6.07	1.86
33	AMX86-G9	109.4	N.B.		10.03	1.04
39	AMX86-H9	104.6	331.5	3.17	10.35	3.66
34	AMX86-A10	460.9	289.4	0.63	6.64	1.40
28	AMX86-B10	77.8	1038.3	13.35	4.73	2.12
42	AMX86-E10	218.1	904.6	4.15	2.44	1.37
36	AMX86-G10	73.7	356.1	4.83	9.88	2.41
37	AMX86-A11	157.2	182.4	1.16	7.05	3.23
29	AMX86-B11	179.9	5950	33.07	9.23	1.69
30	AMX86-D11	198.9	113.9	0.57	10.26	2.59
38	AMX86-F11	255.64	540.6	2.11	7.33	2.87
40	AMX86-H11	366.9	214.9	0.59	7.56	3.02
31	AMX86-F12	423.7	2910.3	6.87	11.88	2.51

PN-IL-23 Clones					1-pt Screen Data		
SEQ ID NO	Clone Name	PN-IL-23	IL-23 K_D(nM)	IL-12 K_D	+/-IL-23 200 nM	+/-IL-23 100 nM	+/-IL-12 200 nM

		Round		(nM)			
43	AMX 84-A10	R10	22.3	N.B.	39.6		2.9
44	AMX 84-B10	R10	21.8	N.B.	22.7		1.3
45	AMX 84-A11	R10	17.8	N.B.	32.7		1.8
46	AMX 84-F11	R10	16.6	N.B.	22.5		0.8
47	AMX 84-E12	R10	27.8	N.B.	15.8		0.8
48	AMX 84-C10	R10	94.3	N.B.	17.7		2.2
49	AMX 84-C11	R10	15.5	286.1	23.4		2.7
50	AMX 84-G11	R10	290.7	N.B.	22.3		1.7
51	ARX33-plate1-H01	R12	77.8	N.B.		20.3	1.7
52	AMX 91-F11	R10	201.7	N.B.		11.4	2.2
53	AMX 91-G1	R10	82.3	N.B.		52.2	1.7
54	AMX 91-E3	R10	205.3	N.B.		34.4	2.9
55	AMX 91-H3	R10	265.7	N.B.		18.5	2.3
56	AMX 91-B5	R10	148.5	N.B.		11.2	0.9
57	AMX 91-A6	R10	60.3	N.B.		6.3	1.1
58	AMX 91-G7	R12	63.6	N.B.		38.1	1.9
59	AMX 91-H7	R12	71.0	N.B.		44.7	1.4
60	AMX 91-B8	R12	17.6	409.1		34.0	7.9
61	AMX 91-H8	R12	16.6	243.2		25.2	4.1
62	AMX 91-G9	R12	33.0	N.B.		31.7	1.1
63	AMX 91-D9	R12	44.6	N.B.		25.1	2.1
64	AMX 91-G11	R12	104.4	N.B.		12.5	1.7
65	AMX 91-C12	R12	30.7	N.B.		22.9	1.9
66	AMX 91-H12	R12	60.8	N.B.		48.6	1.2

N.B. = no significant binding observed

[00238] The nucleic acid sequences of the rRfY aptamers characterized in Table 5 are given below. The unique sequence of each aptamer below begins at nucleotide 25, immediately following the sequence GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGA (SEQ ID NO 11) and runs until it meets the 3'fixed nucleic acid sequence GCUCCGCCAGAGACCAACCGAGAA (SEQ ID NO 12).

[00239] Unless noted otherwise, individual sequences listed below are represented in the 5' to 3' orientation and represent the sequences that bind to IL-23 and/or IL-12 selected under rRfY SELEX™ conditions wherein the purines (A and G) are 2'-OH and the pyrimidines (U and C) are 2'-fluoro. Each of the sequences listed in Table 5 may be derivatized with polyalkylene glycol ("PAG") moieties and may or may not contain capping (e.g., a 3'-inverted dT).

[00240] Table 5. rRfY Clone sequences from h-IL-23 Selection (Round 8), X-IL-23 Selection (round 8), PN-IL-23 Selection (Round10/12).

h-IL-23 Selection (Round 8)

SEQ ID NO 13 (AMX(86)-D5)
GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGAGAGGUAUGUGGUUUUGCCGAGCAACUCGUGUCAGCGGUCAGCUCCGCCAGAGACC
AACCGAGAA

SEQ ID NO 14 (AMX(86)-B7)
GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGAAUGAAUUCCGUCCACGGGCGCCCGAUGAUGUCAGUUUUCGGCUCCGCCAGAGACC
AACCGAGAA

SEQ ID NO 15 (AMX(86)-B5)
GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGAUUAGUGCCGUGUGUUGAAAGGGCUCAUAAUGUCAGUAUCGAGCUCCGCCAGAGACC
AACCGAGAA

SEQ ID NO 16 (AMX(86)-D6)
GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGAUUAGGCGUCCGUGACAAUAACUGGUCCACGAGCAUGUCAGUGCUCCGCCAGAGACC
AACCGAGAA

SEQ ID NO 17 (AMX(86)-G8)
GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGAUGGAAGGCGAUCGUAGCAGUAACCCAAUGAUUGGGACCUAGCUCCGCCAGAGACC
AACCGAGAA

SEQ ID NO 18 (AMX(86)-A7)
GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGAUCUCUUUGGCCGACGCAACAAUGCUCUUUUCCGACCUUGCGCUCCGCCAGAGACCA
ACCGAGAA

SEQ ID NO 19 (AMX(86)-E7)
GGGAAAAGCGAAUCCUACCCAAGAUGUUGUUGGCGUUGAUCGUAUGAUUNAUGGAGNGUGUCNGUGCUCCGCCAGAGAC
CAACCGAGAA

SEQ ID NO 20 (AMX(86)-C7)
GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGAUGCGCUAUGUUUGGCUGGGAAUUGUAGCAUUGCUCAAGUGGCUCCGCCAGAGACC
AACCGAGAA

SEQ ID NO 21 (AMX(86)-F7)
GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGAUGUUGAACCUCUUGUGCGUCCCGAUGUUUNGCAAUGUGGAGCUCCGCCAGAGACC
AACCGAGAA

SEQ ID NO 22 (AMX(86)-F6)
GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGAAUGUAUACAAUGCCCUAUCGUCAGUUAGGCAUGUGUGGAUGCUCCGCCAGAGACC
AACCGAGAA

16

SEQ ID NO 23 (AMX(86)-D8)
GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGACAGAGGCAAUGAGAGCCUGGCGAUGUCAGUCGCAUCUUGCUGCUCCGCCAGAGAC
CAACCGAGAA

SEQ ID NO 24 (AMX(86)-E6)
GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGAUCGCAAAAGGAGUUUGUCUCUGCUCUCGGAGUGUGUCAGUGCUCCGCCAGAGACC
AACCGAGAA

SEQ ID NO 25 (AMX(86)-H7)
GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGAGAUGACUACACGCCAGUGUGCGCUUUUUGCGGAGUUAGCGGCUCCGCCAGAGACC
AACCGAGAA

SEQ ID NO 26 (AMX(86)-C8)
GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGAGUCGUGAUGAUUUGGGUUAUGUCAGUUCCCUGUAUGGUUUCGCUCCGCCAGAGAC
CAACCGAGAA

SEQ ID NO 27 (AMX(86)-C5)
GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGAGUUUUAUGUGGGUCCCGAUGAUUAACUUUAUUGGCGCAUUGCUCCGCCAGAGACC
AACCGAGAA

X-IL-23 Selection (Round 5)

SEQ ID NO 28 (AMX(86)-B10)
GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGAGAACGAGUAUAUUUGCGCUGGCGGAGAAGUCUCUCGAAGGGAGCUCCGCCAGAGA
CCAACCGAGAA

SEQ ID NO 29 (AMX(86)-B11)
GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGAGUAUCAUUCGGCUGGUGGGAGAAAUCUCUGUAGAUAUAGAGCUCCGCCAGAGACC
AACCGAGAA

SEQ ID NO 30 (AMX(86)-D11)
GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGAUAGCGUCUAUGAUGGCGGAGAAGCAAGUGUAGCAUAACAGGCUCCGCCAGAGACC
AACCGAGAA

SEQ ID NO 31 (AMX(86)-F12)
GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGAGUGUUGAAUGAGCGCUGGUGGACAGAUCUUUGGUUACAGAGCUCCGCCAGAGACC
AACCGAGAA

SEQ ID NO 32 (AMX(86)-C9)
GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGACUCAUGGAUAUGGCCUAGCAGCCGUGGAAGCGGUCAUUCUGCUCCGCCAGAGACC
AACCGAGAA

SEQ ID NO 33 (AMX(86)-G9)
GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGAUCCCAGCGGUACGUGAGUCUGUUAAAGGCCACCUAAUGUCGCUCCGCCAGAGACC
AACCGAGAA

SEQ ID NO 34 (AMX(86)-A10)
GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGAGUAAUGUGGGUCCCGAUGAUUCGCUGUGCGGCGUUUGUAGCUCCGCCAGAGACCA
ACCGAGAA

SEQ ID NO 35 (AMX(86)-B9)
GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGAGGUUGAGUACGACGGAGUCNUGGCUAACACGGAAACUAGAGCUCCGCCAGAGACC
AACCGAGAA

77

SEQ ID NO 36 (AMX(86)-G10)
GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGAGUCAUGGCUUACAAUUGAAACAAGAGCUCGCGUGACACAUGCUCCGCCAGAGACC
AACCGAGAA

SEQ ID NO 37 (AMX(86)-A11)
GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGAACGGCUAGGCAUCAAUGGCCAGCAAAAAUAGUCGUGUAAUGCUCCGCCAGAGACC
AACCGAGAA

SEQ ID NO 38 (AMX(86)-F11)
GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGACCAUCGGACGAGGCGGGUCACCUUUUACGCUUUCGAGCUGGCUCCGCCAGAGACC
AACCGAGAA

SEQ ID NO 39 (AMX(86)-H9)
GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGAUGGUUCCCACGUGAAAGUGGCUAGCGAGUACCCCACUUAUGCUCCGCCAGAGACC
AACCAAGGG

SEQ ID NO 40 (AMX(86)-H11)
GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGAGCGCUUUAGCGGGUAUAGCACUUUUCAUCUAAUGAANCCGUAGCUCCGCCAGAGA
CCAACCGAGAA

SEQ ID NO 41 (AMX(86)-A9)
GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGAUCUACGAUUGUUCAGGUUUUUUUGUACUCAACUAAAGGCGAGCUCCGCCAGAGACC
AACCGAGAA

SEQ ID NO 42 (AMX(86)-E10)
GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGAUUGUCUCGGAUUGGUCACUCCCAUUUUUGUUCGCUUAACGGCUCCGCCAGAGACC
AACCGAGAA

PN-IL-23 Selection (Round 10 and 12)

SEQ ID NO 43 (AMX(84)-A10)
GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGAAGUUUUUUGUGCUCUGAGUACUCAGCGUCCGUAAGGGAUAUGCUCCGCCAGAGAC
CAACCGAGAA

SEQ ID NO 44 (AMX(84)-B10)
GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGAAGUGCUUCAUGCGGCAAACUGCAUGACGUCGAAUAGAUAUGCUCCGCCAGAGACC
AACCGAGAA

SEQ ID NO 45 (AMX(84)-A11)
GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGAGAGGUAUGUGGUUUUGCGGAGCAACUCGUGUCAGCGGUCAGCUCCGCCAGAGACC
AACCGAGAA

SEQ ID NO 46 (AMX(84)-F11)
GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGAUGUGCUUGAGUUAAAUCUCAUCGUCCCCGUUUGGGGAUAUGCUCCGCCAGAGACC
AACCGAGAA

SEQ ID NO 47 (AMX(84)-E12)
GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGAAGUUUUUGUGCUCUGAGUACUCAGCGUCCGUAAGGGAUAUGCUCCGCCAGAGACC
AACCGAGAA

SEQ ID NO 48 (AMX(84)-C10)
GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGAGAUGUAUUCAGGCGGUCCGCAUUGAUGUCAGUUAUGCGUAGCUCCGCCAGAGACC
AACCGAGAA

SEQ ID NO 49 (AMX(84)-C11)
GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGAAUGGUCGGAAUCUCUGGCGCCACGCUGAGUAUAGACGGAAGCUCCGCCAGAGACC
AACCGAGAA

SEQ ID NO 50 (AMX(84)-G11)
GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGAGUGCUUCGUAUGUUGAAUACGACGUUUCGCAGGACGAAUAUGCUCCGCCAGAGACC
AACCGAGAA

SEQ ID NO 51 (ARX33-plate1-H01)
AGGGAAAAGGAAUCAUACACAAGAUGUAUCAUCCGGUCGUACAAAAGCGCCACGGAACCAUUCGCUCCGCCAGANACCA
ACCGAGAA

SEQ ID NO 52 (AMX(91)-F11)
GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGACGCGUCAGGUCCACGCUGAAAUUUAUUUUCGGCAGUGUAAGCUCCGCCAGAGACC
AACCGAGAA

SEQ ID NO 53 (AMX(91)-G1)
GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGAUAUGUGCCUGGGAUGGACGACAUCCCCUGUUCUAAGGAUAUGCUCCGCCAGAGACC
AACCGAGAA

SEQ ID NO 54 (AMX(91)-E3)
GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGAUUACUCCGUUAGUGUCAGUUGACGGAGGGAGCGUACUAUUGCUCCGCCAGAGACC
AACCGAGAA

SEQ ID NO 55 (AMX(91)-H3)
GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGACAUUGUGCUUUAUCACGUGGGUGAUAACGACGAAAGUUAUGCUCCGCCAGAGACC
AACCGAGAA

SEQ ID NO 56 (AMX(91)-B5)
GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGACAGUGUAUGAGGAAGAUUACUUCCAUUCCUGAGCGGUUUUCGCUCCGCCAGAGAC
CAACCGAGAA

SEQ ID NO 57 (AMX(91)-A6)
GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGAUUGGCAAUGUGACCUUCAACCCUUUUCCCGAUGAACAGUGGCUCCGCCAGAGACC
AACCGAGAA

SEQ ID NO 58 (AMX(91)-G7)
GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGACAUGACUGCAUGCUUCGGGAGUAUCUCGGUCCCGACGUUCGCUCCGCCAGAGACC
AACCGAGAA

SEQ ID NO 59 (AMX(91)-H7)
GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGACUUAUCGCCUCAAGGGGGGUAAUAAACCCAGCGGUGUGCAUGCUCCGCCAGAGACC
AACCGAGAA

SEQ ID NO 60 (AMX(91)-B8)
GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGAAUCCUGGCUUCGCAUAGUGUAUGGGUAGUACGACAGCGCGUGCUCCGCCAGAGAC
CAACCGAGAA

SEQ ID NO 61 (AMX(91)-H8)
GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGAACGCAUAGUCGGAUUUACCGAUCAUUCUGUUGCCUUCGUGACGCUCCGCCAGAGAC
CAACCGAGAA

SEQ ID NO 62 (AMX(91)-G9)

GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGAAUUGUGCUUACAACUUUCGUUGUACCGACGUGUCAGUUAUGCUCCGCCAGAGACC AACCGAGAA

SEQ ID NO 63 (AMX(91)-D9)
GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGAGUGUAUUACCCCCAACCCAGGGGGACCAUUCGCGUAACAAGCUCCGCCAGAGACC AACCGAGAA

SEQ ID NO 64 (AMX(91)-G11)
GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGACUUAACAGUGCGGGGCGCAGUGUAUAGAUCCGCAAUGUGUGCUCCGCCAGAGACC AACCGAGAA

SEQ ID NO 65 (AMX(91)-C12)
GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGACGAUAGUAUGACCUUUUGAAAGGCUUCCCGAGCGGUGUUCGCUCCGCCAGAGACC AACCGAGAA

SEQ ID NO 66 (AMX(91)-H12)
GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGACGUGUGCUUUAUGUAAACCAUAACGUUCCAUAAGGAAUAUGCUCCGCCAGAGACC AACCGAGAA

[00241] Those sequences having binding activity to the IL-23 target proteins as determined by the dot blot binding assay described above, and that were functional in cell based assays (described below in Example 3), were minimized (described below in Example 2).

EXAMPLE 1B: IL-23 Selections against human IL-23 with ribo/2'O-Me nucleotide containing pools

[00242] Two selections were performed to identify aptamers containing ribo/2'O-Methyl nucleotides. One selection used 2'O-Methyl A, C, and U and 2'OH G (rGmH), and the other selection used 2'-OMe C, U and 2'-OH G, A (rRmY). Both selections were direct selections against h-IL-23 which had been immobilized on a hydrophobic plate. No steps were taken to bias selection of aptamers specific for the p19 or p40 subdomains. Both selections yielded pools significantly enriched for h-IL-23 binding versus naïve, unselected pool. Individual clone sequences are reported herein, and h-IL-23 binding data is provided for selected individual clones.

[00243] Pool Preparation. A DNA template with the sequence 5'–GGGAGAGGAGAGAACGTTCTACN_{30}CGCTGTCGATCGATCGATCGATG–3' (ARC256) (SEQ ID NO 3) was synthesized using an ABI EXPEDITE™ DNA synthesizer, and deprotected by standard methods. The series of N's in the DNA template (SEQ ID NO 3) can be any combination of nucleotides and gives rise to the unique sequence region of the resulting aptamers.

[00244] The template was amplified with the 5' primer 5'-TAATACGACTCACTATAGGGAGAGGAGAGAACGTTCTAC-3' (SEQ ID NO 67) and 3' primer 5'-CATCGATCGATCGATCGACAGC-3' (SEQ ID NO 68) and then used as a template for *in vitro* transcription with Y639F single mutant T7 RNA polymerase. Transcriptions were done at 37° C overnight using 200 mM Hepes, 40 mM DTT, 2 mM spermidine, .01% Triton X-100, 10% PEG-8000, 5 mM $MgCl_2$, 1.5 mM $MnCl_2$, 500 μM NTPs, 500 μM GMP, 0.01 units/μL inorganic pyrophosphatase, and 2 μg/mL Y639F single mutant T7 polymerase. Two different compositions were transcribed, rGmH, and rRmY.

[00245] Selection. Each round of selection was initiated by immobilizing 20 pmoles of h-IL-23 to the surface of Nunc Maxisorp hydrophobic plates for 2 hours at room temperature in 100 μL of 1X Dulbecco's PBS (DPBS ($+Ca^{2+}$, Mg^{2+})). The supernatant was then removed and the wells were washed 4 times with 120 μL wash buffer (1X DPBS, 0.2% BSA, and 0.05% Tween-20). Pool RNA was heated to 90°C for 3 minutes and cooled to room temperature for 10 *minutes* to refold. In Round 1, a positive selection step was conducted. Briefly, 1 x 10^{14} molecules (0.2 nmoles) of pool RNA were incubated in 100 μL binding buffer (1X DPBS and 0.05% Tween-20) in the wells with immobilized protein target for 1 hour. The supernatant was then removed and the wells were washed 4 times with 120 μL wash buffer. In subsequent rounds a negative selection step was included. The pool RNA was also incubated for 30 minutes at room temperature in empty wells to remove any plastic binding sequences from the pool before the positive selection step. The number of washes was increased after Round 4 to increase stringency. In all cases, the pool RNA bound to immobilized h-IL-23 was reverse transcribed directly in the selection plate by the addition of RT mix (3' primer, (SEQ ID NO 68), and Thermoscript™ RT, (Invitrogen, Carlsbad, CA) followed by incubation at 65°C for 1 hour.

[00246] The resulting cDNA was used as a template for PCR using Taq polymerase (New England Biolabs, Beverly, MA). "Hot start" PCR conditions coupled with a 60°C annealing temperature were used to minimize primer-dimer formation. Amplified pool template DNA was desalted with a Centrisep column (Princeton Separations, Adelphia, NJ) according to the manufacturer's recommended conditions, and used to transcribe the pool RNA for the next round of selection. The transcribed pool was gel purified on a 10 % polyacrylamide gel every round. Table 6 shows the RNA concentration used per round of selection.

81

[00247] Table 6. RNA pool concentrations per round of selection.

Round	rRmY (pmoles pool used)	rGmH (pmoles pool used)
1	200	200
2	110	40
3	65	100
4	50	170
5	80	100
6	100	110
7	50	70
8	120	60
9	120	80
10	130	
11	110	

[00248] The selection progress was monitored using the dot blot sandwich filter binding assay as described in Example 1A. The 5'- ^{32}P-labeled pool RNA was refolded at 90°C for 3 minutes and cooled to room temperature for 10 minutes. Next, pool RNA (trace concentration) was incubated with h-IL-23 DPBS plus 0.1 mg/mL tRNA for 30 minutes at room temperature and then applied to a nitrocellulose and nylon filter sandwich in a dot blot apparatus (Schleicher and Schuell). The percentage of pool RNA bound to the nitrocellulose was calculated and monitored approximately every 3 rounds with a single point screen (+/- 250 nM h-IL-23). Pool K_D measurements were measured using a titration of h-IL-23 protein (R&D, Minneapolis, MN) and the dot blot apparatus as described above.

[00249] The rRmY h-IL-23 selection was enriched for h-IL-23 binding vs. the naïve pool after 4 rounds of selection (data not shown). The selection stringency was increased and the selection was continued for 8 more rounds. At Round 9 the pool K_D was approximately 500 nM or higher. The rGmH selection was enriched over the naïve pool binding at Round 10. The pool K_D was also approximately 500 nM or higher. Figure 7 is a binding curve of rRmY and rGmH pool selection binding to h-IL-23. The pools were cloned using TOPO TA cloning kit (Invitrogen, Carlsbad, CA) and individual sequences were generated and tested

for binding. A single point binding screen was initially performed on all crude rRmY clone transcriptions using a 1:200 dilution, +/- 200 nM IL-23, plus 0.1 mg/mL competitor tRNA. A 10 point screen was then performed on 24 of the rRmY clones which showed the best binding in the single point screen. The 10 point screen was performed using zero to 480 nM IL-23 in 3 fold serial dilutions. Binding curves were generated (KaleidaGraph v. 3.51, Synergy Software) and K_Ds were estimated by fitting the data to the equation: fraction RNA bound = amplitude*[h-IL-23]/K_D + [h-IL-23]). Table 7 below shows the sequence data for the rRmY selected aptamers that displayed binding affinity for h-IL-23. There was one group of 6 duplicate sequences and 4 pairs of 2 duplicate sequences out of the rRmY clones generated. Table 8 shows the binding characteristics of the rRmY clones thus tested. Clones were also tested from 48 crude rGmH clone transcriptions at a 1:200 dilution and 0.1 mg/mL tRNA was used as competitor. The average binding over background was only about 14%, whereas the average of the rRmY clones in the same assay was about 30%, with 10 clones higher than 40%. The sequences and binding characterization of the rGmH clones tested are not shown.

[00250] The nucleic acid sequences of the rRmY aptamers characterized in Table 7 are given below. The unique sequence of each aptamer in Table 7 begins at nucleotide 23, immediately following the sequence GGGAGAGGAGAGAACGUUCUAC (SEQ ID NO 69), and runs until it meets the 3'fixed nucleic acid sequence GCUGUCGAUCGAUCGAUCGAUG (SEQ ID NO 70).

[00251] Unless noted otherwise, individual sequences listed below are represented in the 5' to 3' orientation and represent the sequences of the aptamers that bind to IL-23 and/or IL-12 selected under rRmY SELEX™ conditions wherein the purines (A and G) are 2'-OH and the pyrimidines (U and C) are 2'-OMe. Each of the sequences listed in Table 7 may be derivatized with polyalkylene glycol ("PAG") moieties and may or may not contain capping (e.g., a 3'-inverted dT).

[0002] Table 7 – rRmY (Round 10) Sequences

SEQ ID NO 71
GGGAGAGGAGAGAACGUUCUACAAAUGAGAGCAGGCCGAAGAGGAGUCGCUCGCUGUCGAUCGAUCGAUCGAUG

SEQ ID NO 72
GGGAGAGGAGAGAACGUUCUACAAAUGAGAGCAGGCCGAAAAGGAGUCGCUCGCUGUCGAUCGAUCGAUCGAUG

SEQ ID NO 73
GGGAGAGGAGAGAACGUUCUACAAAUGAGAGCAGGCCGAAAAGGAGUCGCUCGCUGUCGAUCGAUCGAUCGAUG

SEQ ID NO 74

GGGAGAGGAGAGAACGUUCUACGGUAAAGCAGGCUGACUGAAAGGUUGAAGUCGCUGUCGAUCGAUCGAUCGAUG

SEQ ID NO 75
GGGAGAGGAGAGAACGUUCUACAGGUUAAGAGCAGGCUCAGGAAUGGAAGUCGCUGUCGAUCGAUCGAUCGAUG

SEQ ID NO 76
GGGAGAGGAGAGAACGUUCUACAACAAAGCAGGCUCAUAGUAAUAUGGAAGUCGCUGUCGAUCGAUCGAUCGAUG

SEQ ID NO 77
GGGAGAGGAGAGAACGUUCUACAACAAAGCAGGCUCAUAGUAAUAUGGAAGUCGCUGUCGAUCGAUCGAUCGAUG

SEQ ID NO 78
GGGAGAGGAGAGAACGUUCUACAAAAGAGAGCAGGCCGAAAAGGAGUCGCUCGCUGUCGAUCGAUCGAUCGAUG

SEQ ID NO 79
GGGAGAGGAGAGAACGUUCUACAAAAGGCAGGCUCAGGGGAUCACUGGAAGUCGCUGUCGAUCGAUCGAUCGAUG

SEQ ID NO 80
GGGAGAGGAGAGAACGUUCUACAAGAUAUAAUUAAGGAUAAGUGCAAAGGAGACGCUGUCGAUCGAUCGAUCGAUG

SEQ ID NO 81
GGGAGAGGAGAGAACGUUCUACGAAUGAGAGCAGGCCGAAAAGGAGUCGCUCGCUGUCGAUCGAUCGAUCGAUG

SEQ ID NO 82
GGGAGAGGAGAGAACGUUCUACGAGAGGCAAGAGAGAGUCGCAUAAAAAAAGACGCUGUCGAUCGAUCGAUCGAUG

SEQ ID NO 83
GGGAGAGGAGAGAACGUUCUACGCAGGCUGUCGUAGACAAACGAUGAAGUCGCGCUGUCGAUCGAUCGAUCGAUG

SEQ ID NO 84
GGGAGAGGAGAGAACGUUCUACGGAAAAAGAUAUGAAAGAAAGGAUUAAGAGACGCUGUCGAUCGAUCGAUCGAUG

SEQ ID NO 85
GGGAGAGGAGAGAACGUUCUACGGAAGGNAACAANAGCACUGUUUGUGCAGGCGCUGUCGAUCNAUCNAUCNAUG

SEQ ID NO 86
GGGAGAGGAGAGAACGUUCUACUAAUGCAGGCUCAGUUACUACUGGAAGUCGCUGUCGAUCGAUCGAUCGAUG

SEQ ID NO 87
AGGAGAGGAGAGAACGUUCUACUAGAAGCAGGCUCGAAUACAAUUCGGAAGUCGCUGUCGAUCGAUCGAUCGAUG

SEQ ID NO 88
GGGAGAGGAGAGAACGUUCUACAUAAGCAGGCUCCGAUAGUAUUCGGGAAGUCGCUGUCGAUCGAUCGAUCGAU

[00252] Table 8 – rRmY IL-23 Clone Binding Data.

SEQ	IL-23 K_D

ID No.	(nM)
72	211.4
83	8.2
86	219.3
80	3786.3
75	479.4
74	257.0
81	303.2
77	258.9
73	101.4
88	101.2
84	602.5
78	123.7
76	77.2
87	122.3
71	124.0
85	239.9
82	198.6
79	806.7

**Assays performed in 1X DPBS (+Ca^{2+}, Mg^{2+}), 30 min RT incubation
**R&D IL-23 (carrier free protein)

EXAMPLE 1C: Selections against human IL-23 with deoxy/2'O-Methyl nucleotide containing pools

[00253] An alternative selection was performed to obtain stabilized aptamers specific for IL-23 using deoxy purines (A and G) and 2'-O-Me pyrimidines (C and U) using the h-IL-23 strategy.

[00254] Pool Preparation. A DNA template with the sequence 5'-GGGAGAGGAGAGAACGTTCTACN$_{30}$CGCTGTCGATCGATCGATCGATG-3' (ARC256, SEQ ID NO 3) was synthesized using an ABI EXPEDITE™ DNA synthesizer, and deprotected by standard methods. The series of N's in the DNA template (SEQ ID NO 3) can be any combination of nucleotides and gives rise to the unique sequence region of the resulting aptamers. The templates were amplified with the 5' primer 5'-

TAATACGACTCACTATAGGGAGAGGAGAGAACGTTCTAC-3' (SEQ ID NO 67) and 3' primer 5'-CATCGATCGATCGATCGACAGC-3' (SEQ ID NO 89) and then used as a template for *in vitro* transcription with Y639F single mutant T7 RNA polymerase. Transcriptions were done at 37° C overnight using 200 mM Hepes, 40 mM DTT, 2 mM spermidine, 0.01% Triton X-100, 10% PEG-8000, 9.6 mM $MgCl_2$, 2.9 mM $MnCl_2$, 2 mM NTPs, 2 mM GMP, 2 mM spermine, 0.01 units/μL inorganic pyrophosphatase, and 2 μg/mL Y639F single mutant T7 polymerase.

[00255] Selection: Each round of selection was initiated by immobilizing 20 pmoles of h-IL-23 to the surface of Nunc Maxisorp hydrophobic plates for 1 hour at room temperature in 100 μL of 1X PBS. The supernatant was then removed and the wells were washed 5 times with 120 μL wash buffer (1X PBS, 0.1 mg/mL tRNA and 0.1 mg/mL salmon sperm DNA ("ssDNA")). In Round 1, a positive selection step was conducted: 100 pmoles of pool RNA (6×10^{13} unique molecules) were incubated in 100 μL binding buffer (1X PBS, 0.1 mg/mL tRNA and 0.1 mg/mL ssDNA) in the wells with immobilized protein target for 1 hour. The supernatant was then removed and the wells were washed 5 times with 120 μL wash buffer. In subsequent rounds a negative selection step was included. The pool RNA was also incubated for 1 hour at room temperature in empty wells to remove any plastic binding sequences from the pool before the positive selection step. Starting at Round 3, a second negative selection step was introduced. The target-immobilized wells were blocked for 1 hour at room temperature in 100 μL blocking buffer (1X PBS, 0.1 mg/mL tRNA, 0.1 mg/mL ssDNA and 0.1 mg/mL BSA) before the positive selection step. In all cases, the pool RNA bound to immobilized h-IL-23 was reverse transcribed directly in the selection plate after by the addition of RT mix (3' primer, (SEQ ID NO 89)), and Thermoscript™ RT (Invitrogen, Carlsbad, CA), followed by incubation at 65°C for 1 hour. The resulting cDNA was used as a template for PCR (Taq polymerase, New England Biolabs, Beverly, MA). "Hot start" PCR conditions coupled with a 68°C annealing temperature were used to minimize primer-dimer formation. Amplified pool template DNA was desalted with a Micro Bio-Spin column (Bio-Rad, Hercules, CA) according to the manufacturer's recommended conditions and used to program transcription of the pool RNA for the next round of selection. The transcribed pool was gel purified on a 10 % polyacrylamide gel every round.

[00256] Protein Binding Analysis. The selection progress was monitored using the sandwich filter binding assay previously described in Example 1A. The 5'-^{32}P-labeled pool

RNA (trace concentration) was incubated with h-IL-23, 1X PBS plus 0.1 mg/mL tRNA, 0.1 mg/mL ssDNA and 0.1 mg/mL BSA for 30 minutes at room temperature and then applied to a nitrocellulose and nylon filter sandwich in a dot blot apparatus (Schleicher and Schnell, Keene, NH). The percentage of pool RNA bound to the nitrocellulose was calculated after Rounds 6, 7 and 8 with a seven point screen with h-IL-23 (0.25 nM, 0.5 nM, 1 nM, 4 nM, 16 nM, 64 nM and 128 nM). Pool K_D measurements were calculated as previously described.

[00257] The dRmY IL-23 selection was enriched for h-IL-23 binding vs. the naïve pool after 6 rounds of selection. At Round 8 the pool K_D was approximately 54 nM or higher. The Round 6, 7 and 8 pools were cloned using a TOPO TA cloning kit (Invitrogen, Carlsbad, CA) and individual sequences were generated. Table 9 lists the sequences of the dRmY clones generated from Round 6, 7 and 8 pools. Protein binding analysis was performed for each clone. Binding assays were performed in 1X PBS +0.1 mg/mL tRNA, 0.1 mg/mL salmon sperm DNA, 0.1 mg/mL BSA, for a 30 minute incubation at room temperature. Table 10 includes the binding characterization for these individual sequences.

[00258] The nucleic acid sequences of the dRmY aptamers characterized in Table 9 are given below. The unique sequence of each aptamer below begins at nucleotide 23, immediately following the sequence GGGAGAGGAGAGAACGUUCUAC (SEQ ID NO 69), and runs until it meets the 3'fixed nucleic acid sequence GCUGUCGAUCGAUCGAUCGAUG (SEQ ID NO 90).

[00259] Unless noted otherwise, individual sequences listed below are represented in the 5' to 3' orientation and represent the sequences of the aptamers that bind to IL-23 and/or IL-12 selected under dRmY SELEX™ conditions wherein the purines (A and G) are deoxy and the pyrimidines (U and C) are 2'-OMe. Each of the sequences listed in Table 9 may be derivatized with polyalkylene glycol ("PAG") moieties and may or may not contain capping (e.g., a 3'-inverted dT).

[00260] Table 9. dRmY IL-23 clone sequences

SEQ ID NO 91 (ARC 489)
GGGAGAGGAGAGAACGUUCUACAGCGCCGGUGGGCGGGCAUUGGGUGGAUGCGCUGUCGAUCGAUCGAUCGAUG

SEQ ID NO 92 (ARC 490)
GGGAGAGGAGAGAACGUUCUACAGCCUUUUGGGUAAGGGGAGGGGUGCCGGUCGCUGUCGAUCGAUCGAUCGAUG

SEQ ID NO 93
GGGAGAGGAGAGAACGUUCUACGUAACGGGGUGGGAGGGGCGAACAACUUGACGCUGUCGAUCGAUCGAUCGAUG

SEQ ID NO 94 (ARC 491)
GGGAGAGGAGAGAACGUUCUACAGCGCCGGUGGGUGGGCAUAGGGUGGAUGCGCUGUCGAUCGAUCGAUCGAUG

SEQ ID NO 95
GGGAGAGGAGAGAACGUUCUACGGGCUACGGGGAUGGAGGGUGGGUCCCAGACGCUGUCGAUCGAUCGAUCGAUG

SEQ ID NO 96
GGGAGAGGAGAGAACGUUCUACACGGGGUGGGAGGGGCGAGUCGCAUGGAUGCGCUGUCGAUCGAUCGAUCGAUG

SEQ ID NO 97 (ARC492)
GGGAGAGGAGAGAACGUUCUACUCAAUGACCGCGCGAGGCUCUGGGAGAG GGCGCUGUCGAUCGAUCGAUCGAUG

[00261] Table 10 - dRmY IL-23 aptamer binding data

SEQ ID No.	IL-23 K_D (nM)	IL-12 K_D (nM)
91	4.0	17.2
92	26.0	37.1
93	186.2	Not tested
94	17.1	93.0
95	432.6	Not tested
96	209.7	Not tested
97	NB	NB

**Assays performed in 1X PBS + 0.1mg/mL tRNA, 0.1mg/mL ssDNA, 0.1mg/mL BSA, 30 min RT incubation
**R&D IL-23 (carrier free protein)
N.B.= no binding detectable

EXAMPLE 1D: Additional Selections against human IL-23 with deoxy/2'O-Methyl nucleotide containing pools

[00262] Introduction: Three selections strategies were used to identify aptamers to h-IL-23 using a pool containing deoxy/2'O-Methyl nucleotides. These selections used 2'O-Me C, and U and deoxy A and G. The first selection strategy (dRmY h-IL-23) was a direct selection against h-IL-23. In the second selection strategy (dRmY h-IL-23/IL-12neg), h-IL-12 was included in the negative selection step to drive enrichment of aptamers binding to p19, the subdomain unique to h-IL-23. In the third selection strategy (dRmY h-IL-23-S), increased stringency was used in the positive selection by including long washes to drive the selection to select for higher affinity aptamers. All three selection strategies yielded aptamers to h-IL-

23. Several aptamers are specific for h-IL-23, and several show cross reactivity between h-IL-23 and h-IL-12.

[00263] dRmY Selection: Round 1 of the dRmY h-IL-23 selection began with $3x10^{14}$ molecules of a 2'O-Me C, and U and deoxy A and G modified RNA pool with the sequence 5'-GGGAGAGGAGAGAACGUUCUAC-N30-GGUCGAUCGAUCGAUCAUCGAUG –3' (ARC520) (SEQ ID NO 98), which was synthesized using an ABI EXPEDITE™ DNA synthesizer, and deprotected by standard methods. The series of N's in the template (SEQ ID NO 98) can be any combination of nucleotides and gives rise to the unique sequence region of the resulting aptamers.

[00264] Each round of selection was initiated by immobilizing 20 pmoles of h-IL-23 to the surface of Nunc Maxisorp hydrophobic plates for 1 hour at room temperature in 100 µL of 1X PBS. The supernatant was then removed and the wells were washed 5 times with 120 µL wash buffer (1X PBS, 0.1 mg/mL tRNA and 0.1 mg/mL salmon sperm DNA ("ssDNA")). In Round 1, 500 pmoles of pool RNA ($3x10^{14}$ molecules) were incubated in 100 µL binding buffer (1X PBS, 0.1 mg/mL tRNA and 0.1 mg/mL ssDNA) in the well with immobilized protein target for 1 hour. The supernatant was then removed and the well was washed 5 times with 120 µL wash buffer. In subsequent rounds a negative selection step was included in which pool RNA was also incubated for 1 hour at room temperature in an empty well to remove any plastic binding sequences from the pool before the positive selection step.

[00265] Starting at Round 3, a second negative selection step was introduced. The pool was subjected to a 1 hour incubation in target-immobilized wells that were blocked for 1 hour at room temperature with 100 µL blocking buffer (1X PBS, 0.1 mg/mL tRNA, 0.1 mg/mL ssDNA and 0.1mg/mL BSA) before the positive selection step (Table 11A). At Round 3, the dRmY h-IL-23 pool was split into the dRmY h-IL-23/IL-12neg selection by subjecting the pool to an additional 1 hour negative incubation step at room temperature in a well that had been blocked for 1 hour at room temperature with 20 pmoles of h-IL-12 and washed 5 times with 120 µL wash buffer, which occurred prior to the positive h-IL-23 positive incubation. The pool was split into additional h-IL-12 blocked wells in later rounds to increase the stringency (See Table 11B).

[00266] An additional method to increase discrimination between h-IL-23 and h-IL-12 binding was to add h-IL-12 to the positive selection along with the pool at a low

concentration, in which the specific h-IL-23 binders would bind to the immobilized h-IL-23, and the h-IL-12 binders would be washed away after the 1 hour incubation. The dRmY h-IL-23-S selection was split from the dRmY h-IL-23 pool at Round 6 with the addition of "stringent washes" in the positive selection, in which after the 1 hour incubation with h-IL-23, the pool was removed, then 100 µL of 1X PBS, 0.1 mg/mL tRNA, and 0.1 mg/mL salDNA was added and incubated for 30 minutes (Table 11C). This stringent wash procedure was removed and repeated, with the intentions of selecting for molecules with high affinities.

[00267] In all cases, the pool RNA bound to immobilized h-IL-23 was reverse transcribed directly in the selection plate by the addition of RT mix (3' primer, 5'-CATCGATGATCGATCGATCGAC-3' (SEQ ID NO 100)), and Thermoscript™ RT, (Invitrogen, Carlsbad, CA) followed by incubation at 65°C for 1 hour. The resulting cDNA was used as a template for PCR (20 mM Tris pH 8.4, 50 mM KCl, 2 mM $MgCl_2$, 0.5 µM of 5' primer 5'-TAATACGACTCACTATAGGGAGAGGAGAGAACGTTCTAC-3' (SEQ ID NO 99), 0.5 µM of 3' primer (SEQ ID NO 100), 0.5 mM each dNTP, 0.05 units/µL Taq polymerase (New England Biolabs, Beverly, MA)). PCR reactions were done under the following cycling conditions: a): 94°C for 30 seconds; b) 55°C for 30 seconds; c) 72°C for 30 seconds. The cycles were repeated until sufficient PCR product was generated. The minimum number of cycles required to generate sufficient PCR product is reported in Tables 11A-11C as the "PCR Threshold".

[00268] The PCR templates were purified using the QIAquick PCR purification kit (Qiagen, Valencia, CA) and used to program transcription of the pool RNA for the next round of selection. Templates were transcribed overnight at 37°C using 200 mM Hepes, 40 mM DTT, 2 mM spermidine, 0.01% Triton X-100, 10% PEG-8000, 9.6 mM $MgCl_2$, 2.9 mM $MnCl_2$, 2 mM NTPs, 2 mM GMP, 2 mM spermine, 0.01 units/µL inorganic pyrophosphatase, and 2 µg/mL Y639F single mutant T7 polymerase. Transcription reactions were quenched with 50 mM EDTA and ethanol precipitated, then purified on a 1.5 mm denaturing polyacrylamide gel (8 M urea, 10% acrylamide; 19:1 acrylamide:bisacrylamide). Pool RNA was removed from the gel by passive elution at 37°C in 300 mM NaOAc, 20 mM EDTA, followed by ethanol precipitation. The selection conditions for each round are provided in the following tables.

[00269] Table 11A: dRmY hIL-23 selection conditions

IL-23

Round #	RNA pool conc (μM)	IL-23 conc (μM)	untreated well neg	BSA-blocked well neg	PCR Threshold
1	5	0.2	none	none	18
2	0.6	0.2	1hr	none	17
3	0.75	0.2	1hr	1hr	17
4	1	0.2	1hr	1hr	17
5	0.75	0.2	1hr	1hr	17
6	1	0.2	1hr	1hr	15
7	1	0.2	1hr	1hr	15
8	1	0.2	1hr	1hr	16

[00270] Table 11B: dRmY IL-23/IL-12neg selection conditions

IL-23/12neg

Round #	RNA pool conc (μM)	IL-23 conc (μM)	untreated well neg	BSA-blocked well neg	IL-12 neg conc (μM)	# IL-12 wells	IL-12 pos conc (μM)	PCR Threshold
1	5	0.2	none	none	0	0	0	18
2	0.6	0.2	1hr	none	0	0	0	17
3	0.75	0.2	1hr	1hr	0.2	1	0	17
4	1	0.2	1hr	1hr	0.2	1	0	17
5	0.75	0.2	1hr	1hr	0.2	2	0	17
6	1	0.2	1hr	1hr	0.2	2	0	15
7	1	0.2	1hr	1hr	0.2	3	0.02	15
8	1	0.2	1hr	1hr	0.2	3	0.05	15

[00271] Table 11C: dRmY hIL-23-S selection conditions

IL-23S

Round #	RNA pool conc (μM)	IL-23 conc (μM)	untreated well neg	BSA-blocked well neg	# 30min positive washes	PCR Threshold

1	5	0.2	none	none	0	18
2	0.6	0.2	1hr	none	0	17
3	0.75	0.2	1hr	1hr	0	17
4	1	0.2	1hr	1hr	0	17
5	0.75	0.2	1hr	1hr	0	17
6	1	0.2	1hr	1hr	2	15
7	1	0.2	1hr	1hr	2	16
8	1	0.2	1hr	1hr	2	16

[00272] Protein Binding Analysis: Dot blot binding assays were performed throughout the selections to monitor the protein binding affinity of the pools as previously described in Example 1A. When a significant positive ratio of binding of RNA in the presence of h-IL-23 versus in the absence of h-IL-23 was seen, the pools were cloned using a TOPO TA cloning kit (Invitrogen, Carlsbad, CA) according to the manufacturer's instructions. Similar sequences were seen in all three selections from the pools having gone through six rounds, and 45 unique clones amongst the three selections were chosen for screening. The 45 clones were synthesized on an ABI EXPEDITE™ DNA synthesizer, then deprotected by standard methods. The 45 individual clones were gel purified on a 10% PAGE gel, and the RNA was passively eluted in 300 mM NaOAc and 20 mM EDTA, followed by ethanol precipitation.

[00273] The clones were 5'end labeled with γ-^{32}P ATP, and were assayed for both IL-23 and IL-12 binding in a 3-point dot blot screen (0 nM, 20 nM, and 100 nM h-IL-23; 0 nM, 20 nM, and 100 nM h-IL-12) (data not shown). Clones showing significant binding in the 20 nM and 100 nM protein conditions for both IL-23 and IL-12 were further assayed for K_D determination using a protein titration from 0 nM to 480 nM (3 fold dilutions) in the dot blot assay previously described. K_D values were determined by fitting an equation describing a 1:1 RNA:protein complex to the resulting data (fraction aptamer bound = amplitude*([IL-23]/(K_D + [IL-23])) + background binding) (KaleidaGraph v. 3.51, Synergy Software). Results of protein binding characterization for the higher affinity clones are tabulated in Table 13, and corresponding clone sequences are listed in Table 12.

[00274] The nucleic acid sequences of the dRmY aptamers characterized in Table 12 are given below. The unique sequence of each aptamer below begins at nucleotide 23, immediately following the sequence GGGAGAGGAGAGAACGUUCUAC (SEQ ID NO

101), and runs until it meets the 3'fixed nucleic acid sequence GUCGAUCGAUCGAUCAUCGAUG (SEQ ID NO 102).

[00275] Unless noted otherwise, individual sequences listed below are represented in the 5' to 3' orientation and represent the sequences of the aptamers that bind to IL-23 and/or IL-12 selected under dRmY SELEX™ conditions wherein the purines (A and G) are deoxy and the pyrimidines (C and U) are 2'-OMe. Each of the sequences listed in Table 12 may be derivatized with polyalkylene glycol ("PAG") moieties and may or may not contain capping (e.g., a 3'-inverted dT).

[00276] Table 12: dRmY clone sequences

SEQ ID NO 103 (ARC611)
GGGAGAGGAGAGAACGUUCUACAGGCAAGGCAAUUGGGGAGUGUGGGUGGGGGGGUCGAUCGAUCGAUCAUCGAUG

SEQ ID NO 104 (ARC612)
GGGAGAGGAGAGAACGUUCUACAGGCAAGUAAUUGGGGAGUGCGGGCGGGGGGGGUCGAUCGAUCGAUCAUCGAUG

SEQ ID NO 105 (ARC614)
GGGAGAGGAGAGAACGUUCUACAAGGCGGUACGGGGAGUUGUGGGUUGGGGGCCGGUCGAUCGAUCGAUCAUCGAUG

SEQ ID NO 106 (ARC616)
GGGAGAGGAGAGAACGUUCUACGAUAUAGGCGGUACGGGGGGAGUGGGCUGGGGGUCGAUCGAUCGAUCAUCGAUG

SEQ ID NO 107 (ARC620)
GGGAGAGGAGAGAACGUUCUACAGGAAAGGCGCUUGCGGGGGGUGAGGGAGGGGUCGAUCGAUCGAUCAUCGAUG

SEQ ID NO 108 (ARC621)
GGGAGAGGAGAGAACGUUCUACAGGCGGUUACGGGGAUGCGGGUGGGACAGGUCGAUCGAUCGAUCAUCGAUG

SEQ ID NO 109 (ARC626)
GGGAGAGGAGAGAACGUUCUACAGGCAAGUAAUUGGGGAGUGCGGGCGGGGGGUCGAUCGAUCGAUCAUCGAUG

SEQ ID NO 110 (ARC627)
GGGAGAGGAGAGAACGUUCUACAGGCAAGUAAUUGGGGAGUGCGGGCGGGGUGUCGAUCGAUCGAUCAUCGAUG

SEQ ID NO 111 (ARC628)
GGGAGAGGAGAGAACGUUCUACAGGCAAGGCAAUUGGGGAGCGUGGGUGGGGGGGUCGAUCGAUCGAUCAUCGAUG

SEQ ID NO 112 (ARC632)
GGGAGAGGAGAGAACGUUCUACAAUUGCAGGUGGUGCCGGGGUUGGGGGCGGGUCGAUCGAUCGAUCAUCGAUG

SEQ ID NO 113 (ARC635)
GGGAGAGGAGAGAACGUUCUACAGGCUCAAAAGAGGGGGAUGUGGGAGGGGGUCGAUCGAUCGAUCAUCGAUG

SEQ ID NO 114 (ARC642)
GGGAGAGGAGAGAACGUUCUACAGGCGCAGCCAGCGGGGAGUGAGGGUGGGGGUCGAUCGAUCGAUCAUCGAUG

SEQ ID NO 115 (ARC643)
GGGAGAGGAGAGAACGUUCUACAGGCCGAUGAGGGGGAGCAGUGGGUGGGGGGUCGAUCGAUCGAUCAUCGAUG

SEQ ID NO 116 ARC644)
GGGAGAGGAGAGAACGUUCUACUAGUGAGGCGGUAACGGGGGGUGAGGGUGGGGUCGAUCGAUCGAUCAUCGAUG

SEQ ID NO 117 (ARC645)
GGGAGAGGAGAGAACGUUCUACAGGUAGGCAAGAUAUUGGGGGAAGCGGGUGGGGUCGAUCGAUCGAUCAUCGAUG

SEQ ID NO 118 (ARC 646)
GGGAGAGGAGAGAACGUUCUACACAUGGCUCGAAAGAGGGGCGUGAGGGUGGGGUCGAUCGAUCGAUCAUCGAUG

[00277] **Table 13: Summary of dRmY clone binding**

SEQ ID NO	ARC #	Selection	K_D hIL-23 (nM)	K_D hIL-12 (nM)
103	ARC611	R7 hIL-23/12neg	21.3	123.1
104	ARC612	R7 hIL-23/12neg	5.8	41.7
105	ARC614	R7 hIL-23/12neg	3.1	54.4
106	ARC616	R7 hIL-23/12neg	13.1	52.1
107	ARC620	R7 hIL-23/12neg	44.8	178.7
108	ARC621	R7 hIL-23/12neg	28.8	111.9
109	ARC626	R7 hIL-23S	10.1	69.8
110	ARC627	R7 hIL-23S	7	79.5
111	ARC628	R7 hIL-23S	57.8	146.5
112	ARC632	R7 hIL-23S	19.1	63.9
113	ARC635	R7 hIL-23S	171.5	430.9
114	ARC642	R7 hIL-23	37.2	188.3
115	ARC643	R7 hIL-23S	71.6	309.4
116	ARC644	R7 hIL-23	34.5	192.9
117	ARC645	R7 hIL-23	33.5	137.3
118	ARC646	R7 hIL-23	207.9	382.6

*30 min RT incubation for K_D determination in dot blot assay
*1X PBS +0.1mg/mL tRNA, salmon sperm DNA, BSA reaction buffer

Human IL-23 Aptamer Selections Summary

[00278] The different selection conditions and strategies for IL-23 SELEX™ yielded several aptamers, stabilized and/or minimized, having different binding characteristics. The rRfY selected aptamers have affinities approximately in the 15 nM to 460 nM range, and prior to any post-SELEX™ optimization, have cellular potency with IC_{50}s approximately in the 50 nM-to 5 μM range. These can be further minimized with appropriate gains in binding characteristics and are expected to show increased potency in cell based assays. These aptamers also show the greatest distinction between IL-23, having a greater than hundred fold discrimination of IL-23 to IL-12.

[00279] The aptamers obtained under the rRmY selection conditions have affinities ranging from approximately 8 nM to 3 μM. However, their cellular potency is lower than the rRfY aptamers' potency. As for the rGmH constructs a single point screen was done, but not carried any further because their extent of binding over background was not as good as the rRmY clones. 48 crude rGmH clone transcriptions were used at a 1:200 dilution and 0.1 mg/mL tRNA was used as competitor. The average binding over background was only about 14%, whereas the rRmY clone's average in the same assay was about 30%, with 10 clones higher than 40 %.

[00280] The dRmY selected aptamers have high affinities in the range of ~3 nM to ~200 nM, and prior to any post-SELEX™ optimization, show a remarkable cellular potency with IC_{50}s in the range of ~50 nM to ~500 nM (described in Example 3 below). Some of these aptamers also have a distinction of approximately 4 fold for IL-23 to IL-12, which may be improved upon by further optimization.

EXAMPLE 1E: Selections against mouse ("m")-IL-23 with 2'-F pyrimidine containing pools (rRfY)

[00281] Introduction: Two selections strategies were used to identify aptamers to mIL-23 using a pool consisting of 2'-OH purine and 2'-F pyrimidine nucleotides (rRfY composition). The first selection strategy (mIL-23) was a direct selection against mIL-23. The second selection strategy (mIL-23S) was a more stringent selection, in which the initial rounds had lower concentrations of RNA and protein in an attempt to drive the selection towards higher affinity binders. Both selection strategies yielded aptamers to mIL-23.

[00282] Selection: Two selections (mIL-23 and mIL-23S) began with incubation of $2x10^{14}$ molecules of 2'F pyrimidine modified pool with the sequence 5' GGAGCGCACUCAGCCAC-N40-UUUCGACCUCUCUGCUAGC 3' (ARC275) (SEQ ID NO 119), including a spike of γ^{32}P ATP 5' end labeled pool, with mouse IL-23 (isolated in-house). The series of N's in the template (SEQ ID NO 119) can be any combination of nucleotides and gives rise to the unique sequence region of the resulting aptamers.

[00283] In Round 1 of the mIL-23 selection, pool RNA was incubated with 50 pmoles of protein in a final volume of 100 µL for 1 hr at room temperature. In Round 1 of the mIL-23S selection, pool RNA was incubated with 65 pmoles of mIL-23 in a final volume of 1300 µL for 1 hr at room temperature. Selections were performed in 1X PBS buffer. RNA:mIL-23 complexes and free RNA molecules were separated using 0.45 µm nitrocellulose spin columns from Schleicher & Schuell (Keene, NH). The columns were pre-washed with 1 mL 1X PBS, and then the RNA:protein containing solutions were added to the columns and spun in a centrifuge at 2000 rpm for 1 minute. Buffer washes were performed to remove nonspecific binders from the filters (Round 1, 2 x 500 µL 1X PBS; in later rounds, more stringent washes of increased number and volume to enrich for specific binders), then the RNA:protein complexes attached to the filters were eluted with 2 x 200 µL washes (2 x 100 µL washes in later rounds) of elution buffer (7 M urea, 100 mM sodium acetate, 3 mM EDTA, pre-heated to 90°C). The eluted RNA was precipitated (40 µg glycogen, 1 volume isopropanol). The RNA was reverse transcribed with the Thermoscript™ RT-PCR system (Invitrogen, Carlsbad, CA) according to the manufacturer's instructions, using the 3' primer 5'GCTAGCAGAGAGGTCGAAA 3' (SEQ ID NO 121), followed by PCR amplification (20 mM Tris pH 8.4, 50 mM KCl, 2 mM $MgCl_2$, 0.5µM of 5' primer 5'TAATACGACTCACTATAGGAGCGCACTCAGCCAC 3' (SEQ ID NO 120), 0.5 µM of 3' primer (SEQ ID 121), 0.5 mM each dNTP, 0.05 units/µL Taq polymerase (New England Biolabs, Beverly, MA)). PCR reactions were done under the following cycling conditions: a) 94°C for 30 seconds; b) 60°C for 30 seconds; c) 72°C for 30 seconds. The cycles were repeated until sufficient PCR product was generated. The minimum number of cycles required to generate sufficient PCR product is reported in Table14 as the "PCR Threshold".

[00284] The PCR templates were purified using the QIAquick PCR purification kit (Qiagen, Valencia, CA). Templates were transcribed using α^{32}P GTP body labeling overnight at 37°C (4% PEG-8000, 40 mM Tris pH 8.0, 12 mM $MgCl_2$, 1 mM spermidine,

0.002 % Triton X-100, 3 mM 2'OH purines, 3 mM 2'F pyrimidines, 25 mM DTT, 0.25 units/100 µL inorganic pyrophosphatase, 2 µg/mL T7 Y639F single mutant RNA polymerase, 5uCi α^{32}P GTP).

[00285] Subsequent rounds were repeated using the same method as for Round 1, but with the addition of a negative selection step. Prior to incubation with protein target, the pool RNA was passed through a 0.45 micron nitrocellulose filter column to remove filter binding sequences, then the filtrate was carried on into the positive selection step. In alternating rounds the pool RNA was gel purified. Transcription reactions were quenched with 50 mM EDTA and ethanol precipitated then purified on a 1.5 mm denaturing polyacrylamide gels (8 M urea, 10% acrylamide; 19:1 acrylamide:bisacrylamide). Pool RNA was removed from the gel by passive elution in 300 mM NaOAc, 20 mM EDTA, followed by ethanol precipitation with the addition of 300 mM sodium acetate and 2.5 volumes of ethanol.

[00286] The RNA remained in excess of the protein throughout the selections (~1 µM RNA). The protein concentration was dropped to varying lower concentrations based on the particular selection. Competitor tRNA was added to the binding reactions at 0.1 mg/mL starting at Round 2 or 3, depending on the selection. A total of 7 rounds were completed, with binding assays performed at select rounds. Table 14 contains the selection details including pool RNA concentration, protein concentration, and tRNA concentration used for each round. Elution values (ratio of CPM values of protein-bound RNA versus total RNA flowing through the filter column) along with binding assays were used to monitor selection progress.

[00287] Table 14: rRfY mIL-23 Selection conditions:

1. rRfY mIL-23

Round #	RNA pool conc (µM)	protein conc (nM)	neg	tRNA (mg/mL)	%elution	PCR Threshold
1	3.3	500	none	0	2.64	8
2	1	500	filter	0.1	4.24	8
3	~1	200	filter	0.1	0.73	10
4	1	200	filter	0.1	3.71	8
5	~1	100	filter	0.1	0.41	10

6	1	100	filter	0.1	9.27	8
7	~1	100	filter	0.1	0.87	9

2. rRfY mIL-23B (stringent)

Round #	RNA pool conc (μM)	protein conc (nM)	neg	tRNA (mg/mL)	%elution	PCR Threshold
1	0.25	50	none	0	2.79	8
2	0.1	50	filter	0	4.14	8
3	~1	50	filter	0.1	0.16	11
4	1	50	filter	0.1	2.57	8
5	~1	25	filter	0.1	0.42	10
6	0.8	25	filter	0.1	10.29	8
7	~1	25	filter	0.1	0.13	10

[00288] rRfY mIL-23 Protein Binding Analysis: Dot blot binding assays were performed throughout the selections to monitor the protein binding affinity of the pools as previously described. When a significant level of binding of RNA in the presence of mIL-23 was observed, the pools were cloned using a TOPO TA cloning kit (Invitrogen, Carlsbad, CA) according to the manufacturer's instructions. For both mIL-23 selections, the Round 7 pool templates were cloned, and 16 individual clones from each selection were assayed using an 8-point mIL-23 titration. Seven of the 32 total clones screened had specific binding curves and are listed below in Table 16. Table 15 lists the corresponding sequences. All others displayed nonspecific binding curves similar to the unselected naïve pool. Clones with high affinity to mIL-23 were subsequently screened for protein binding against mouse IL-12, human IL-23 and human IL-12 in the same manner.

[00289] The nucleic acid sequences of the rRfY aptamers characterized in Table 15 are given below. The unique sequence of each aptamer below begins at nucleotide 18, immediately following the sequence GGAGCGCACUCAGCCAC (SEQ ID NO 122), and runs until it meets the 3'fixed nucleic acid sequence UUUCGACCUCUCUGCUAGC (SEQ ID NO 123).

[00290] Unless noted otherwise, individual sequences listed below are represented in the 5' to 3' orientation and represent the sequences that bind to mouse IL-23 selected under rRfY SELEX™ conditions wherein the purines (A and G) are 2'-OH and the pyrimidines (C and U) are 2'-fluoro. Each of the sequences listed in Table 15 may be derivatized with polyalkylene glycol ("PAG") moieties and may or may not contain capping (e.g., a 3'-inverted dT).

[00291] Table 15: mIL-23 rRfY Clone Sequences

SEQ ID NO 124 (ARC1628)
GGAGCGCACUCAGCCACAGGUGGCUUAAUACUGUAAAGACGUGCGCGCAGAGGGAUUUUCGACCUCUCUGCUAGC

SEQ ID NO 125 (ARC1629)
GGAGCGCACUCAGCCACCGUAAUUCACAAGGUCCCUGAGUGCAGGGUUGUAUGUUUGUUUCGACCUCUCUGCUAGC

SEQ ID NO 126 (ARC1630)
GGAGCGCACUCAGCCACUCUACUCGAUAUAGUUUAUCGAGCCGGUGGUAGAUUAUGAUUUCGACCUCUCUGCUAGC

SEQ ID NO 127 (ARC1631)
GGAGCGCACUCAGCCACGCCUACAAUUCACUGUGAUAUAUCGAAUUAUAGCCCUGGUUUCGACCUCUCUGCUAGC

SEQ ID NO 128 (ARC1632)
GGAGCGCACUCAGCCACCGGCUUAAUAUCCAAUAGGAACGUUCGCUCUGAGCAGGCGUUUCGACCUCUCUGCUAGC

SEQ ID NO 129 (ARC1633)
GGAGCGCACUCAGCCACAGCUCGGUGGCUUAAUAUCUAUGUGAACGUGCGCAACAGCUUUCGACCUCUCUGCUAGC

SEQ ID NO 130 (ARC1634)
GGAGCGCACUCAGCCACCUUGGGCUUAAUACCUAUCGGAUGUUGCGCCUAGCACGGAAUUUCGACCUCUCUGCUAGC

[00292] Table 16: mIL-23 rRfY Clone binding activity

SEQ ID NO	Clone Name	Selection	K_D mIL-23 (nM)	K_D mIL-12 (nM)	K_D hIL-23 (nM)	K_D hIL-12 (nM)
124	ARC1628	R7 mIL-23	2	6	52	161
125	ARC1629	R7 mIL-23	34	103	31	75
126	ARC1630	R7 mIL-23S	14	18	65	239
127	ARC1631	R7 mIL-23S	33	72	39	69
128	ARC1632	R7 mIL-23S	13	16	91	186
129	ARC1633	R7 mIL-23S	17	44	79	195
130	ARC1634	R7 mIL-23S	3	29	39	63

*30min RT incubation for K_D determination
*1X PBS +0.1mg/mL BSA reaction buffer

EXAMPLE 1F: Selections for mouse IL-23 aptamers with specificity against mouse IL-12

[00293] Introduction. One selection was performed to identify aptamers to mouse-IL-23 (mIL-23) with specificity against mouse IL-12 (mIL-12). This selection was split off from the rRfY selection mIL-23S described in the above section starting at Round 3. This selection yielded aptamers to mIL-23 that had ~3-5-fold specificity over mIL-12.

mIL-23S/mIL-12 neg rRfY Selection. To obtain mouse IL-23 aptamers with specificity against mouse IL-12, mouse IL-12 was included in a negative selection, similar to the protein in negative (PN-IL-23) selection described above in Example 1A. The resultant RNA from Round 2 of the mIL-23S selection described in Example 1E above was used to start the R3PN mIL-23/12neg selection, in which mIL-12 was included in the negative step of selection. Nine rounds of selection were performed, with binding assays performed at select rounds. Table 17 summarizes the selection conditions including pool RNA concentration, protein concentration, and tRNA concentration used for each round. Elution values (ratio of CPM values of protein-bound RNA versus total RNA flowing through the filter column) along with binding assays were used to monitor selection progress.

[00294] Table 17: rRfY mIL-23S/mIL-12 neg Filter Selection Summary

Round #	RNA pool conc (μM)	protein conc (nM)	neg	tRNA (mg/mL)	neg mIL12 conc (nM)	%elution	PCR cycle #
1	0.25	50	none	0	0	2.79	8
2	0.1	50	filter	0	0	4.14	8
3	~1	500	filter/IL12	0.1	250	1.33	10
4	1	500	filter/IL12	0.1	500	1.68	8
5	1	250	filter/IL12	0.1	250	0.89	9
6	1	200	filter/IL12	0.1	200	1.47	8
7	1	150	filter/IL12	0.1	150	1.39	8
8	1	150	filter/IL12	0.1	150	3.73	8
9	1	150	filter/IL12	0.1	150	2.98	8

Selection buffer: 1X PBS
*1hr positive incubation

[00295] rRfY mIL-23S/mIL-12 neg Protein Binding Analysis. The dot blot binding assays previously described were performed throughout the selection to monitor the protein binding affinity of the pool. Trace ^{32}P-labeled RNA was combined with mIL-23 or mIL-12 and incubated at room temperature for 30 min in 1X PBS plus 0.1mg/mL BSA for a final volume of 30 µL. The reaction was added to a dot blot apparatus (Schleicher and Schuell Minifold-1 Dot Blot; Acrylic). Binding curves were generated as described in previous sections. When a significant level of binding of RNA in the presence of mIL-23 was observed, the pool was cloned using the TOPO TA cloning kit (Invitrogen, Carlsbad, CA) according to the manufacturer's instructions. The Round 9 pool template was cloned, and 10 individual clones from the selection were assayed in an 8-point dot blot titration against mIL-23. Clones that bound significantly to mIL-23 were then screened for binding to mIL-12. Table 18 summarizes protein binding characterization of the binding clones. Four of the 10 total clones screened bound specifically to mIL-23 and mIL-12 at varying affinities. All other clones displayed nonspecific binding curves similar to the unselected naïve pool. The sequences for the four binding clones are listed in Table 19 below.

[00296] Table 18: rRfY mIL-23S/mIL-12 neg Clone binding activity

SEQ ID NO	Clone Name	K_D mIL-23 (nM)	K_D mIL-12 (nM)
131	AMX369.F1	63	165
132	AMX369.H1	23	194
133	AMX369.B2	49	252
134	AMX369.G3	106	261

*30min RT incubation for K_D determination
*1X PBS +0.1mg/mL BSA reaction buffer

[00297] The nucleic acid sequences of the rRfY aptamers characterized in Table 19 are given below. The unique sequence of each aptamer below begins at nucleotide 18, immediately following the sequence GGAGCGCACUCAGCCAC (SEQ ID NO 122), and runs until it meets the 3'fixed nucleic acid sequence UUUCGACCUCUCUGCUAGC (SEQ ID NO 123).

[00298] Unless noted otherwise, individual sequences listed below are represented in the 5' to 3' orientation and represent the sequences that bind to mouse IL-23 selected under rRfY SELEX™ conditions wherein the purines (A and G) are 2'-OH and the pyrimidines (U and C)

are 2'-fluoro. Each of the sequences listed in Table 19 may be derivatized with polyalkylene glycol ("PAG") moieties and may or may not contain capping (*e.g.*, a 3'-*inverted dT*).

[00299] Table 19: rRfY mIL-23S/mIL-12 neg Sequence Information

SEQ ID NO 131 (AMX(369)_F1)

GGAGCGCACUCAGCCACGGUUUACUUCCGUGGCAAUAUUGACCUCNCUCUAGACAGGUUUCGACCUCUCUGCUAGC

SEQ ID NO 132 (AMX(369)_H1) (ARC 1914)

GGAGCGCACUCAGCCACCUGGGAAAAUCUGGGUCCCUGAGUUCUAACAGCAGAGAUUUUUCGACCUCUCUGCUAGC

SEQ ID NO 133 (AMX(369)_B2)

GGAGCGCACUCNGCCACUUCGGAAUAUCGUUGUCUUCUGGGUGAGCAUGCGUUGAGGUUUCNACCUCUCUGCUAGC

SEQ ID NO 134 (AMX(369)_G3)

GGAGCGCACUCAGCCACUGGGGAACAUCUCAUGUCUCUGACCGCUCUUGCAGUAGAAUUUNGACCUCUCUGCUAGC

EXAMPLE 2: COMPOSITION AND SEQUENCE OPTIMIZATION AND SEQUENCES

EXAMPLE 2A: Minimization

[00300] Following a successful selection and following the determination of sequences of aptamers, in addition to determination of functionality *in vitro*, the sequences were minimized to obtain a shorter oligonucleotide sequence that retained binding specificity to its intended target but had improved binding characteristics, such as improved K_D and/or IC_{50}s.

Example 2A.1: Minimization of rRfY Clones:

[00301] The binding parent clones from the rRfY selection described in Example 1A fell into two principal families of aptamers, referred to as Type 1 and Type 2. Figure 8A and 8B show examples of the sequences and predicted secondary structure configurations of Type 1 and Type 2 aptamers. Figure 9A and 9B show the minimized aptamer sequences and predicted secondary structure configurations for Types 1 and 2.

[00302] On the basis of the IL-23 binding analysis described in Example 1 above and the cell based assay data described in Example 3 below, several Type 1 clones from the rRfY PN-IL-23 selection including AMX84-A10 (SEQ ID NO 43), AMX84-B10 (SEQ ID NO 44), and AMX84-F11 (SEQ ID NO 46) were chosen for further characterization. Minimized DNA construct oligonucleotides were transcribed, gel purified, and tested in dot blot assays for binding to h-IL-23.

[00303] The minimized clones A10min5 (SEQ ID NO 139), A10min6 (SEQ ID NO 140) were based on AMX84-A10 (SEQ ID NO 43), the minimized clones B10min4 (SEQ ID NO 144), and B10min5 (SEQ ID NO 145) were based on AMX84-B10 (SEQ ID NO 44), and the

minimized clone F11min2 (SEQ ID NO 147), was based on AMX84-F11 (SEQ ID NO 46) (Figure 9A). The clones were 5'end labeled with γ-^{32}P ATP, and were assayed in dot blot assays for K_D determination using the same method as for the parent clones. All had significant protein binding (summarized in Table 21), and each was more potent than the respective parent clones from which they are derived when tested in cell based assays as discussed in Example 3 below.

[00304] Additionally, minimized constructs exemplifying Type1 and Type 2 aptamers were made and tested based on the concensus sequence of Type 1 and Type 2 aptamer sequence families. Type1.4 (SEQ ID NO 151) , and Type1.5 (SEQ ID NO 152) are two examples of such minimized constructs based on the Type 1 family sequence, which displayed high IL-23 binding affinity and the most potent activity in the cell based assay described in Example 3, as compared to the other Type 1 minimers described above.

[00305] The resulting rRfY minimers' sequences are listed in Table 20 below. Table 21 shows the minimer binding data for the minimers listed in Table 20.

[00306] For the minimized rRfY aptamers described in Table 20 below, the purines (A and G) are 2'-OH purines and the pyrimidines (C and U) are 2'-fluoro pyrimidines. Unless noted otherwise, the individual sequences are represented in the 5' to 3' orientation. Each of the sequences listed in Table 20 may be derivatized with polyalkylene glycol ("PAG") moieties and may or may not contain capping (e.g., a 3'-inverted dT).

[00307] Table 20 – PN-IL-23 2' F (rRfY) Minimer Aptamer sequences.

SEQ ID NO 135 (A10.min1)
GGAGAUCAUACACAAGAAGUUUUUUGUGCUCUGAGUACUCAGCGUCCGUAAGGGAUCUCC

SEQ ID NO 136 (A10.min2)
GGAGUCUGAGUACUCAGCGUCCGUAAGGGAUAUGCUCCGCCAGACUCC

SEQ ID NO 137 (A10.min3)
GGAGUUACUCAGCGUCCGUAAGGGAUAUGCUCCGACUCC

SEQ ID NO 138 (A10.min4)
GGAGUCUGAGUACUCAGCGUCCCGAGAGGGGAUAUGCUCCGCCAGACUCC

SEQ ID NO 139 (A10.min5)
GGAGCAUACACAAGAAGUUUUUUGUGCUCUGAGUACUCAGCGUCCGUAAGGGAUAUGCUCC

SEQ ID NO 140 (A10.min6)
GGAGUACGCCGAAAGGCGCUCUGAGUACUCAGCGUCCGUAAGGGAUACUCC

SEQ ID NO 141 (B10.min1)
GGAGCGAAUCAUACACAAGAAGUGCUUCAUGCGGCAAACUGCAUGACGUCGAAUAGAUAUGCUCC

SEQ ID NO 142 (B10.min2)
GGAUCAUACACAAGAAGUGCUUCAUGCGGCAAACUGCAUGACGUCGAAUAGAUCC

SEQ ID NO 143 (B10.min3)
GGAUCAUACACAAGAAGUGCUUCACGAAAGUGACGUCGAAUAGAUCC

SEQ ID NO 144 (B10.min4)
GGAGCAUACACAAGAAGUGCUUCAUGCGGCAAACUGCAUGACGUCGAAUAGAUAUGCUCC

SEQ ID NO 145 (B10.MIN5)
GGAGUACACAAGAAGUUCUUCCGAAAGGACGUCGAAUAGAUACUCC

SEQ ID NO 146 (F11.min1)
GCUUAAAUCUCAUCGUCCCCGUUUGGGGAU

SEQ ID NO 147 (F11.min2)
GGACAUACACAAGAUGUGCUUGAGUUAAAUCUCAUCGUCCCCGUUUGGGGAUAUGUC

SEQ ID NO 148 (Type 1.1)
GGCAUACACGAGAGUGCUGUCGAAAGACUCGGCCGAGAGGCUAUGCC

SEQ ID NO 149 (Type1.2)
GGCAUACGCGAGAGCGCUGGCGAAAGCCUCGGCCGAGAGGCUAUGCC

SEQ ID NO 150 (Type1.3)
GGAUACCCGAGAGGGCUGGCGAAAGCCUCGGCGAGAGCUAUCC

SEQ ID NO 151 (Type1.4)
GGCUACGCCGAAAGGCGCUUCCGAAAGGACGUCCGUAAGGGAUACCC

SEQ ID NO 152 (Type1.5)
GGAGUACGCCGAAAGGCGCUUCCGAAAGGACGUCCGUAAGGGAUACUCC

SEQ ID NO 153 (Type 2.1)
GGAAUCAUACCGAGAGGUAUUACCCCGAAAGGGGACCAUUCC

SEQ ID NO 154 (D9.1)
GGAAUCAUACACAAGAGUGUAUUACCCCCAACCCAGGGGGACCAUUCC

SEQ ID NO 155 (C11.1)
GGAAGAAUGGUCCGAAUCUCUGGCGCCACGCUGAGUAUAGACGGAAGCUCCGCCAGA

SEQ ID NO 156 (C11.2)
GGAGGCGCCACGCUGAGUAUAGACGGAAGCUCCGCCUCC

SEQ ID NO 157 (C10.1)
GCACACAAGAGAUGUAUUCAGGCCGUCCGCAUUGAUGUCAGUUAUGCGUAGCUCCGCC

SEQ ID NO 158 (C10.2)
GGCGGUCCGCAUUGAUGUCAGUUAUGCGUAGCUCCGCC

[00308] Table 21 – PN-IL-23 rRfY Minimer Binding data

SEQ ID No.	Clone Description	+/-IL-23 20 nM	+/-IL-23 100 nM	IL-23 K_D (nM)
135	A10min1	2.2	3.1	
136	A10min2	4.4	6.0	
137	A10min3	0.8	1.6	
138	A10min4	0.9	0.7	
146	F11min1	0.8	0.6	
147	F11min2	7.8	16.9	65
141	B10min1	7.5	33.9	
142	B10min2	1.3	1.6	
143	B10min3	0.6	0.8	
139	A10min5	12.8	40.9	57.8
140	A10min6	13.6	41.7	48.3
144	B10min4	39.4	122.1	36.4
145	B10min5	20.7	89.2	276.9
148	IL-23 Type 1.1	1.4	0.9	
149	IL-23 Type 1.2	0.8	0.7	
150	IL-23 Type 1.3	0.8	0.6	
153	IL-23 Type 2.1	1.7	5.2	
154	D9.1	1.2	3.9	
155	C11.1	1.0	3.5	
156	C11.2	1.1	2.3	
157	C10.1	1.4	4.4	
158	C10.2	1.4	1.5	
151	IL-23 Type 1.4	2.3	11.7	185.3
152	IL-23 Type 1.5	5.2	26.9	31.4

**Assays performed +0.1mg/mL tRNA, 30min RT incubation
**R&D IL-23 (carrier free protein)

Example 2A.2: Minimization of dRmY Selection 1:

[00309] Following the dRmY selection process for aptamers binding to IL-23 (described in Example 1C above) and determination of the oligonucleotide sequences, the sequences were systematically minimized to obtain shorter oligonucleotide sequences that retain the binding characteristics. On the basis of the IL-23 binding analysis described in Example 1A above and the cell based assay data described in Example 3 below, ARC489 (SEQ ID NO 91) (74mer) was chosen for further characterization. 3 minimized constructs based on clone ARC489 (SEQ ID NO 91) were designed and generated. The clones were 5'end labeled with γ-^{32}P ATP, and were assayed in dot blot assays for K_D determination using the same method as for the parent clones in 1X PBS +0.1 mg/mL tRNA, 0.1 mg/mL salmon sperm DNA, 0.1 mg/mL BSA, for a 30 minute incubation at room temperature. Table 22 shows the sequences for the minimized dRmY aptamers. Table 23 includes the binding data for the dRmY minimized aptamers. Only one minimized clone, ARC527 (SEQ ID NO 159), showed binding to IL-23. This clone was tested in the TransAM™ STAT3 activation assay described in Example 3 below, and showed a decrease in assay activity compared to its respective parent, ARC489 (SEQ ID NO 91).

[00310] For the minimized dRmY aptamers described in Table 22 below, the purines (A and G) are deoxy-purines and the pyrimidines (U and C) are 2'-OMe pyrimidines. Unless noted otherwise, the individual sequences are represented in the 5' to 3' orientation. Each of the sequences listed in Table 22 may be derivatized with polyalkylene glycol ("PAG") moieties and may or may not contain capping (e.g., a 3'-inverted dT).

[00311] Table 22: Sequences of dRmY Minimized

SEQ ID NO 159 (ARC527)
ACAGCGCCGGUGGGCGGGCAUUGGGUGGAUGCGCUGU

SEQ ID NO 160 (ARC528)
GCGCCGGUGGGCGGGCACCGGGUGGAUGCGCC

SEQ ID NO 161 (ARC529) ACAGCGCCGGUGUUUUCAUUGGGUGGAUGCGCUGU

[00312] Table 23: Binding characterization of dRmY selection 1 minimers

SEQ ID NO	Clone Name	K_D (nM)

SEQ ID 159	ARC 527	12.6
SEQ ID 160	ARC 528	NB
SEQ ID 161	ARC 529	NB

**R&D IL-23 (carrier free protein)
N.B.= no binding detectable

Example 2A.3: Minimization of dRmY Selection 2:

[00313] Following the dRmY selection process for aptamers binding to IL-23 (described in Example 1D above) and determination of the oligonucleotide sequences, the sequences were systematically minimized to obtain shorter oligonucleotide sequences that retain the binding characteristics

[00314] Based on sequence analysis and visual inspection of the parent dRmY aptamer sequences described in Example 1D, it was hypothesized that the active conformation of dRmY h-IL-23 binding clones and their minimized constructs fold into a G-quartet structure (Figure 10). Analysis of the functional binding sequences revealed a pattern of G doubles consistent with a G quartet formation (Table 24). The sequences within the G quartet family fell into 2 subclasses, those with 3 base pairs in the 1st stem and those with 2. It has been reported that in much the same way that ethidium bromide fluorescence is increased upon binding to duplex RNA and DNA, that N-methylmesoporphyrin IX (NMM) fluorescence is increased upon binding to G-quartet structures (Arthanari *et al.*, Nucleic Acids Research, 26(16): 3724 (1996); Marathais *et al.*, Nucleic Acids Research, 28(9): 1969 (2000); Joyce *et al.*, Applied Spectroscopy, 58(7): 831 (2004)). Thus as shown in Figure 11, NMM fluorescence was used to confirm that ARC979 (SEQ ID NO 177) does in fact adopt a G-quartet structure. According to the literature protocols, 100 microliter reactions containing ~1 micromolar NMM and ~2 micromolar aptamer in Dulbecco's PBS containing magnesium and calcium were analyzed using a SpectraMax Gemini XS fluorescence plate reader. Fluorescence emission spectra were collected from 550 to 750 nm with and excitation wavelength of 405 nm. The G-quartet structure of the anti-thrombin DNA aptamer ARC183 (Macaya *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci., 90: 3745 (1993)) was used as a positive control in this experiment. ARC1346 is an aptamer of a similar size and nucleotide composition as ARC979 (SEQ ID NO 177) that is not predicted to have a G-quartet structure and was used as a negative control in the experiment. As can be seen in Figure 11, ARC183 and ARC979 (SEQ

ID NO 177) show a significant increase in NMM fluorescence relative to NMM alone while the negative control, ARC1346 does not.

[00315] Minimized constructs were synthesized on an ABI EXPEDITE™ DNA synthesizer, then deprotected by standard methods. The minimized clones were gel purified on a 10% PAGE gel, and the RNA was passively eluted in 300 mM NaOAc and 20 mM EDTA, followed by ethanol precipitation.

[00316] The clones were 5'end labeled with γ-^{32}P ATP, and were assayed in dot blot assays for K_D determination using the direct binding assay in which the aptamer was radio-labeled and held at a trace concentration (< 90 pM) while the concentration of IL-23 was varied, in 1X PBS with 0.1 mg/mL BSA, for a 30 minute incubation at room temperature. The fraction aptamer bound vs. [IL-23] was used to calculate the K_D by fitting the following equation to the data:

Fraction aptamer bound = amplitude*([IL-23]/(K_D + [IL-23])) + background binding.

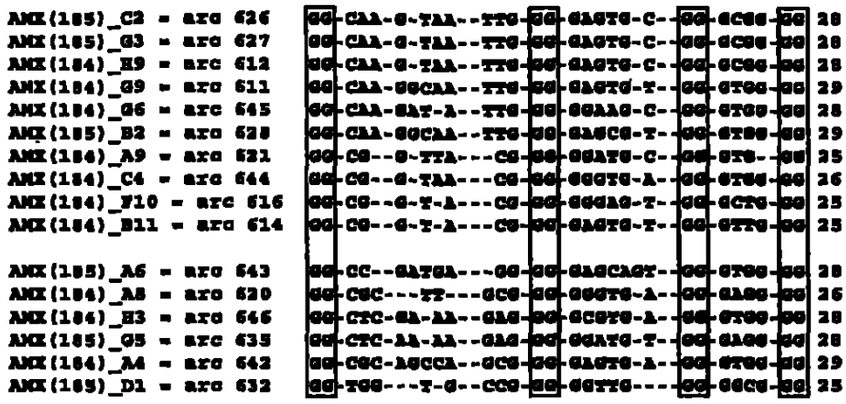
[00317] Several of the minimized constructs from the dRmY Selection 2 were also assayed in a competition format in which cold aptamer was titrated and competed away trace ^{32}P ATP labeled aptamer In the competition assay, the [IL-23] was held constant, the [trace labeled aptamer] was held constant, and the [unlabeled aptamer] was varied. The K_D was calculated by fitting the following equation to the data:

Fraction aptamer bound = amplitude*([aptamer]/(K_D + [aptamer])) + background binding.

[00318] Minimers based upon the G quartet were functional binders, whereas minimers based on a folding algorithm that predicts stem loops (RNAstructure; D.H. Mathews, *et al.*, "Expanded Sequence Dependence of Thermodynamic Parameters Improves Prediction of RNA Secondary Structure". Journal of Molecular Biology, 288, 911-940, (1999)) and that did not contain the pattern of G doubles were non functional (ARC793 (SEQ ID NO 163)).

[00319] Table 25 below summarizes the minimized sequences and the parent clone from which they were derived, and Table 26 summarizes the binding characterization from direct binding assays (+/- tRNA) and competition binding assays for the minimized constructs tested.

[00320] Table 24: Alignment of functional clones. (only the regions within the G quartet are represented)



[00321] The SEQ ID NOS for the clones listed in Table 24 are found in Table 12.

[00322] For the minimized dRmY aptamers described in Table 25 below, the purines (A and G) are deoxy-purines and the pyrimidines (C and U) are 2'-OMe pyrimidines. Unless noted otherwise, the individual sequences are represented in the 5' to 3' orientation. Each of the sequences listed in Table 25 may be derivatized with polyalkylene glycol ("PAG") moieties and may or may not contain capping (*e.g.*, a 3'-inverted dT).

[00323] Table 25: dRmY minimer sequences

SEQ ID NO	Parent Clone	Minimer	Minimized Sequence
162	ARC627	ARC792	GGCAAGUAAUUGGGGAGUGCGGGCGGGG
163	ARC614	ARC793	CUACAAGGCGGUACGGGGAGUGUGG
164	ARC614	ARC794	GGCGGUACGGGGAGUGUGGGUUGGGGCCGG
165	ARC616	ARC795	CGAUAUAGGCGGUACGGGGGGAGUGGGCUGGGGUCG
166	ARC626	ARC796	UAAUUGGGGAGUGCGGGCGGGGGGUCGAUCG
167	ARC626	ARC797	GGUGGGGAGUGCGGGCGGGGGGUCGCC
168	ARC627	ARC889	ACAGGCAAGGUAAUUGGGGAGUGCGGGCGGGGUGU
169	ARC627	ARC890	CCAGGCAAGGUAAUUGGGGAGUGCGGGCGGGGUGG
170	ARC627	ARC891	GGCAAGGUAAUUGGGAAGUGUGGGCGGGG
171	ARC627	ARC892	GGCAAGGUAAUUGGGUAGUGAGGGCGGGG
172	ARC627	ARC893	GGCAAGGUAAUUGGGGAGUGCGGGCUGGG

173	ARC627	ARC894	GGCAAGGUAAUUGGGAAGUGUGGGCUGGG
174	ARC627	ARC895	GGCAAGGUAAUUGGGUAGUGAGGGCUGGG
175	ARC627	ARC896	ACAGGCAAGGUAAUUGGGUAGUGAGGGCUGGGUGU
176	ARC627	ARC897	GAUGUUGGCAAGUAAUUGGGGAGUGCGGGCGGGGUUCAUC-3T
177	ARC627	ARC979	ACAGGCAAGUAAUUGGGGAGUGCGGGCGGGGUGU
178	ARC627	ARC980	CCAGGCAAGUAAUUGGGGAGUGCGGGCGGGGUGG
179	ARC621	ARC981	GGCGGUUACGGGGGAUGCGGGUGGG
180	ARC621	ARC982	GGCGGUUACGGGGGAUGCGGGUGGGACAGG
181	ARC627	ARC1117	GGCAAGUAAUUGGGGAGUGCGGGCGG
182	ARC627	ARC1118	ACAGGCAAGUAAUUGGGGAGUGCGGGCGGUGU
183	ARC614	ARC1119	GGCGGUACGGGGAGUGUGGGUUGGGGCC
184	ARC614	ARC1120	GGCGGUACGGGGAGUGUGGGCUGGGGCC
185	ARC614	ARC1121	GGUACGGGGAGUGUGGGUUGGG
186	ARC614	ARC1122	GGUACGGGGAGUGUGGGCUGGG
187	ARC614	ARC1123	GGCGGUACGGGGAGUGUGGGUUGGGCC
188	ARC614	ARC1124	GGCGGUACGGGGAGUGUGGGCUGGGCC
189	ARC614	ARC1125	GGUACGGGGAGUGUGGGUUGG
190	ARC614	ARC1126	GGUACGGGGAGUGUGGGCUGG
191	ARC616	ARC1127	GGCGGUACGGGGGGAGUGGGCUGGGGUC
192	ARC616	ARC1128	GGCGGUACGGGGGGAGUGGGCUGGGUC
193	ARC616	ARC1129	GGCGGUACGGGGAGAGUGGGCUGGGGUC
194	ARC616	ARC1130	GGUACGGGGGGAGUGGGCUGGG
195	ARC616	ARC1131	GGUACGGGGGGAGUGGGCUGG
196	ARC616	ARC1132	GGUACGGGGAGAGUGGGCUGGG
197	ARC616	ARC1170	GGCGGUACGGGGGGAGUGGGCUGGG
198	ARC614	ARC1171	GGCGGUACGGGGAGUGUGGGUUGGG

[00324] **Table 26: protein binding characterization of dRmY minimers**

SEQ ID NO	Minimer ARC#	K_D (+tRNA) nM	K_D (-tRNA) nM	K_D (competition) nM
162	ARC792	117		11

164	ARC794	69		14
165	ARC795	40		4
166	ARC796	106		
167	ARC797	50		
168	ARC889	115		
169	ARC890	114		
170	ARC891	177		
171	ARC892	255		
172	ARC893	2857		
173	ARC894	no binding		
174	ARC895	no binding		
175	ARC896	no binding		
176	ARC897	93		
177	ARC979	93	90	9
178	ARC980	139		
179	ARC981	no binding		
180	ARC982	no binding		
181	ARC1117	<parent clone		
182	ARC1118	<parent clone		
183	ARC1119	<parent clone		
184	ARC1120	<parent clone		
185	ARC1121	<parent clone		
186	ARC1122	<parent clone		
187	ARC1123	<parent clone		
188	ARC1124	<parent clone		
189	ARC1125	<parent clone		
190	ARC1126	<parent		

		clone		
191	ARC1127	<parent clone		
192	ARC1128	<parent clone		
193	ARC1129	<parent clone		
194	ARC1130	<parent clone		
195	ARC1131	<parent clone		
196	ARC1132	<parent clone		
197	ARC1170	no binding		
198	ARC1171	no binding		

[00325] The competitive binding data was re-analyzed in a saturation binding experiment where the concentration of ligand (aptamer) was varied and the concentration of receptor (IL-23) was held constant and the [bound aptamer] was plotted versus the [total input aptamer]. ARC979 (SEQ ID NO 177) was used in this analysis.

[00326] The [ARC979] bound saturated at ~ 1.7 nM (Figure 12), which suggested that the concentration of IL-23 that was competent to bind aptamer was 1 nM, or 2 % (1/50) of the input IL-23. The calculated K_D value was 8 nM, which agreed well with the value obtained by fitting the data represented in competition mode (8.7 nM).

[00327] When IL-12 competition binding data was subjected to the same analysis (Figure 13), the fraction active IL-12 was higher (10%), and the specificity of ARC979 for IL-23 vs. IL-12 (33-fold) was greater than what was predicted by the direct binding measurements (2 – 5 fold).

[00328] Subsequently, the direct binding assay was repeated for ARC979 using the binding reaction conditions described previously (1X PBS with 0.1 mg/mL BSA for 30 minute incubation at room temperature) and using different binding reaction conditions (1X Dulbecco's PBS (with Mg^{++} and Ca^{++}) with 0.1 mg/ mL BSA for 30 minutes at room temperature). In both, newly chemically synthesized aptamers were purified using denaturing polyacrylamide gel electrophoresis, 5'end labeled with γ-^{32}P ATP and were tested for direct

binding to full human IL-23. An 8 point protein titration was used in the dot blot binding assay (either {100 nM, 30 nM, 10 nM, 3 nM, 1 nM, 300 pM, 100 pM, 0 pM} or {10 nM, 3 nM, 1 nM, 300 pM, 100 pM, 30 pM, 10 pM, 0 pM}). K_D values were calculated by fitting the equation y= (max/(1+K/protein))+yint using KaleidaGraph (KaleidaGraph v. 3.51, Synergy Software). The buffer conditions appeared to affect the binding affinity somewhat. Under the 1X PBS condition, the K_D value for ARC979 was calculated to be ~ 10 nM, whereas under the 1X Dulbecco's PBS condition, the K_D value for ARC979 was calculated to be ~1 nM. (see Figure 14). These K_D values were verified in subsequent assays (data not shown), and are consistent with the IC_{50} value of ~ 6 nM that ARC979 yields in the PHA Blast assay described below in Example 3D.

Example 2A.4: Mouse IL-23 rRfY Minimization

[00329] Based on visual inspection of the parent clone sequences of the mouse IL-23 rRfY aptamers described in Example 1E, and predicted RNA structures using an RNA folding program (RNAstructure), minimized constructs were designed for each of the seven binding mIL-23 clones. PCR templates for the minimized construct oligos were ordered from Integrated DNA Technologies (Coraville, IA). Constructs were PCR amplified, transcribed, gel purified, and tested for binding to mIL-23 using the dot blot binding assay previously described. Trace ^{32}P-labeled RNA was combined with mIL-23 and incubated at room temperature for 30 min in 1X PBS plus 0.1 mg/mL BSA for a final volume of 30 µL. The reaction was added to a dot blot apparatus (Schleicher and Schuell Minifold-1 Dot Blot, Acrylic). Binding curves were generated as described in previous sections. Table 32 lists the sequences of the mIL-23 binding minimized constructs. Table 33 summarizes the protein binding characterization for each rRfY minimized construct that had significant binding to mIL-23.

[00330] Unless noted otherwise, individual sequences listed below are represented in the 5' to 3' orientation and represent the sequences that bind to mouse IL-23 selected under rRfY SELEX™ conditions wherein the purines (A and G) are 2'-OH and the pyrimidines (U and C) are 2'-fluoro. Each of the sequences listed in Table 32 may be derivatized with polyalkylene glycol ("PAG") moieties and may or may not contain capping (e.g., a 3'-inverted dT).

[00331] Table 32 minimized mouse rRfY clone sequences

SEQ ID NO 199 (ARC 1739)

GGGCACUCAGCCACAGGUGGCUUAAUACUGUAAAGACGUGCCC

SEQ ID NO 200 (ARC 1918)

GGAGCGCACUCAGCCACCGGCUUAAUAUCCAAUAGGAACGUUCGCUCU

SEQ ID NO 201

GGGCACUCAGCCACAGCUCGGUGGCUUAAUAUCUAUGUGAACGUGCCC

SEQ ID NO 202

GGGCACUCAGCCACCUUGGGCUUAAUACCUAUCGGAUGUGCCC

[00332] Table 33: mIL-23 rRfY Clone K_D Summary

Minimized Clone SEQ ID NO	Parent Clone Name	Parent Clone SEQ ID NO	K_D mIL-23 (nM)
199	ARC1628	124	1
200	ARC1632	128	1
201	ARC1633	129	25
202	ARC1634	130	19

*30min RT incubation for K_D determination
*1X PBS +0.1mg/mL BSA reaction buffer

EXAMPLE 2B: Optimization through Medicinal Chemistry

[00333] Aptamer Medicinal Chemistry is an aptamer improvement technique in which sets of variant aptamers are chemically synthesized. These sets of variants typically differ from the parent aptamer by the introduction of a single substituent, and differ from each other by the location of this substituent. These variants are then compared to each other and to the parent. Improvements in characteristics may be profound enough that the inclusion of a single substituent may be all that is necessary to achieve a particular therapeutic criterion.

[00334] Alternatively the information gleaned from the set of single variants may be used to design further sets of variants in which more than one substituent is introduced simultaneously. In one design strategy, all of the single substituent variants are ranked, the top 4 are chosen and all possible double (6), triple (4) and quadruple (1) combinations of these 4 single substituent variants are synthesized and assayed. In a second design strategy, the best single substituent variant is considered to be the new parent and all possible double

substituent variants that include this highest-ranked single substituent variant are synthesized and assayed. Other strategies may be used, and these strategies may be applied repeatedly such that the number of substituents is gradually increased while continuing to identify further-improved variants.

[00335] Aptamer Medicinal Chemistry is most valuable as a method to explore the local, rather than the global, introduction of substituents. Because aptamers are discovered within libraries that are generated by transcription, any substituents that are introduced during the SELEX™ process must be introduced globally. For example, if it is desired to introduce phosphorothioate linkages between nucleotides then they can only be introduced at every A (or every G, C, T, U etc.) (globally substituted). Aptamers which require phosphorothioates at some As (or some G, C, T, U etc.) (locally substituted) but cannot tolerate it at other As cannot be readily discovered by this process.

[00336] The kinds of substituent that can be utilized by the Aptamer Medicinal Chemistry process are only limited by the ability to generate them as solid-phase synthesis reagents and introduce them into an oligomer synthesis scheme. The process is certainly not limited to nucleotides alone. Aptamer Medicinal Chemistry schemes may include substituents that introduce steric bulk, hydrophobicity, hydrophilicity, lipophilicity, lipophobicity, positive charge, negative charge, neutral charge, zwitterions, polarizability, nuclease-resistance, conformational rigidity, conformational flexibility, protein-binding characteristics, mass etc. Aptamer Medicinal Chemistry schemes may include base-modifications, sugar-modifications or phosphodiester linkage-modifications.

[00337] When considering the kinds of substituents that are likely to be beneficial within the context of a therapeutic aptamer, it may be desirable to introduce substitutions that fall into one or more of the following categories:

(1) Substituents already present in the body, *e.g.*, 2'-deoxy, 2'-ribo, 2'-O-methyl purines or pyrimidines or 5-methyl cytosine.
(2) Substituents already part of an approved therapeutic, *e.g.*, phosphorothioate-linked oligonucleotides.
(3) Substituents that hydrolyze or degrade to one of the above two categories, *e.g.*, methylphosphonate-linked oligonucleotides.

Example 2B.1: Optimization of ARC979 by Phosphorothioate substitution.

[00338] ARC979 (SEQ ID NO 177) is a 34 nucleotide aptamer to IL-23 of dRmY composition. 21 phosphorothioate derivatives of ARC979 were designed and synthesized in which single phosphorothioate substitutions were made at each phosphate linkage (ARC1149 to ARC1169) (SEQ ID NO 203 to SEQ ID NO 223) (see Table 27). These molecules were gel purified and assayed for IL-23 binding using the dot blot assay as described above and compared to each other and to the parent molecule, ARC979. An 8 point IL-23 titration (0 nM to 300 nM, 3 fold serial dilutions) was used in the binding assay. Calculated K_Ds are summarized in Table 28.

[00339] The inclusion of phosphorothioate linkages in ARC979 was well tolerated when compared to ARC979. Many of these constructs have an increased proportion binding to IL-23 and additionally have improved (*i.e.*, lower) K_D values (Figure 15). A similar increase in affinity is seen in competition assays (Figure 16), which further supports that the phosphorothioate derivatives of ARC979 compete for IL-23 at a higher affinity than ARC979.

[00340] Unless noted otherwise, each of the sequences listed in Table 27 below are in the 5'-3' direction, may be derivatized with polyalkylene glycol ("PAG") moieties, and may or may not contain capping (e.g., a 3'-inverted dT).

[00341] Table 27: Sequences of ARC979 phosphorothioate derivatives: Single Phosphorothioate substitutions

SEQ ID NO	ARC#	Phosphorothioate linker between bases (x,y)		Sequence
203	ARC1149	1	2	ACAGGCAAGUAAUUGGGGAGUGCGGGCGGGGUGU
204	ARC1150	2	3	ACAGGCAAGUAAUUGGGGAGUGCGGGCGGGGUGU
205	ARC1151	6	7	ACAGGCAAGUAAUUGGGGAGUGCGGGCGGGGUGU
206	ARC1152	7	8	ACAGGCAAGUAAUUGGGGAGUGCGGGCGGGGUGU
207	ARC1153	8	9	ACAGGCAAGUAAUUGGGGAGUGCGGGCGGGGUGU
208	ARC1154	9	10	ACAGGCAAGUAAUUGGGGAGUGCGGGCGGGGUGU
209	ARC1155	10	11	ACAGGCAAGUAAUUGGGGAGUGCGGGCGGGGUGU
210	ARC1156	11	12	ACAGGCAAGUAAUUGGGGAGUGCGGGCGGGGUGU

211	ARC1157	12	13	ACAGGCAAGUAAUUGGGGAGUGCGGGCGGGGUGU
212	ARC1158	13	14	ACAGGCAAGUAAUUGGGGAGUGCGGGCGGGGUGU
213	ARC1159	14	15	ACAGGCAAGUAAUUGGGGAGUGCGGGCGGGGUGU
214	ARC1160	15	19	ACAGGCAAGUAAUUGGGGAGUGCGGGCGGGGUGU
215	ARC1161	19	20	ACAGGCAAGUAAUUGGGGAGUGCGGGCGGGGUGU
216	ARC1162	20	21	ACAGGCAAGUAAUUGGGGAGUGCGGGCGGGGUGU
217	ARC1163	21	22	ACAGGCAAGUAAUUGGGGAGUGCGGGCGGGGUGU
218	ARC1164	22	23	ACAGGCAAGUAAUUGGGGAGUGCGGGCGGGGUGU
219	ARC1165	26	27	ACAGGCAAGUAAUUGGGGAGUGCGGGCGGGGUGU
220	ARC1166	27	28	ACAGGCAAGUAAUUGGGGAGUGCGGGCGGGGUGU
221	ARC1167	28	29	ACAGGCAAGUAAUUGGGGAGUGCGGGCGGGGUGU
222	ARC1168	32	33	ACAGGCAAGUAAUUGGGGAGUGCGGGCGGGGUGU
223	ARC1169	33	34	ACAGGCAAGUAAUUGGGGAGUGCGGGCGGGGUGU

[00342] Table 28: K_D summary for ARC979 phopsphorothioate derivatives

SEQ ID NO	ARC#	K_D (+tRNA) nM	K_D (-tRNA) nM	K_D (competition) nM
177	ARC979	93	90	9
203	ARC1149	not tested		
204	ARC1150	not tested		
205	ARC1151		142	
206	ARC1152		232	
207	ARC1153		174	
208	ARC1154		412	
209	ARC1155		168	
210	ARC1156		369	
211	ARC1157		69	
212	ARC1158		192	

213	ARC1159		77	
214	ARC1160		38	5
215	ARC1161		55	6
216	ARC1162		47	6
217	ARC1163		49	8
218	ARC1164		79	
219	ARC1165		55	
220	ARC1166		132	
221	ARC1167		107	
222	ARC1168		82	
223	ARC1169		74	

Example 2B.2: Optimization: 2'-OMe, phosphorothioate and Inosine substitutions

[00343] Systematic modifications were made to ARC979 (SEQ ID NO 177) to increase overall stability and plasma nuclease resistance. The most stable and potent variant of ARC979 was identified through a systematic synthetic approach involving 4 phases of aptamer synthesis, purification and assay for binding activity. The first step in the process was the synthesis and assay for binding activity of ARC1386 (SEQ ID NO 224) (ARC979 with a 3'-inverted-dT). Once ARC1386 (SEQ ID NO 224) was shown to bind to IL-23 with an affinity similar to that of the parent molecule ARC979 (SEQ ID NO 177), all subsequent derivatives of ARC979 were synthesized with a stabilizing 3'-inverted-dT.

[00344] The dot blot binding assay previously described was used to characterize the relative potency of the majority of the aptamers synthesized. For K_D determination, chemically synthesized aptamers were purified using denaturing polyacrylamide gel electrophoresis, 5'end labeled with γ-^{32}P ATP and were tested for direct binding to full human IL-23. An 8 point protein titration was used in the dot blot binding assay (either {100 nM, 30 nM, 10 nM, 3 nM, 1 nM, 300 pM, 100 pM, 0 pM} or {10 nM, 3 nM, 1 nM, 300 pM, 100 pM, 30 pM, 10 pM, 0 pM}) in Dulbecco's PBS (with Mg^{++} and Ca^{++}) with 0.1 mg/mL BSA. K_D values were calculated by fitting the equation y= (max/(1+K/protein))+yint using KaleidaGraph (KaleidaGraph v. 3.51, Synergy Software). Sequences of the ARC979 derivatives synthesized, purified and assayed for binding to IL-23 as well as the results of the protein binding characterization are tabulated below in Tables 29 and 30. As can be seen in

Table 30, and as previously described in Example 2A.3 above, ARC1386 (SEQ ID NO 224) (which is ARC979 (SEQ ID NO 177) with a 3' inverted dT) has a K_D of 1 nM under these conditions.

[00345] In phase 1 of the optimization process, comprised of ARC1427-ARC1471 (SEQ ID NOs 225-269), each individual purine residue in ARC1386 (SEQ ID NO 224) was replaced by the corresponding 2'-O methyl containing residue. Additionally in phase 1, a series of individual and composite phosphorothioate substitutions were tested based on results generated previously which had suggested that in addition to conferring nuclease stability, phosphorothioate substitutions enhanced the binding affinity of derivatives of ARC979. Finally at the end of phase 1, a series of aptamers were tested that explored further the role of stem 1 in the functional context of ARC979/ARC1386. As seen from the binding data in Table 30, many positions readily tolerated substitution of a deoxy residue for a 2'-O methyl residue. Addition of any particular phosphorothioate did not appear to confer a significant enhancement in the affinity of the aptamers. Interestingly, as can be seen by comparison of ARC1465-1471 (SEQ ID NOs 263-269), stem 1 was important for maintenance of high affinity binding, however its role appeared to be a structural clamp since introduction of PEG spacers between the aptamer core and the 2 strands that comprise stem 1 did not appear to significantly impact the binding properties of the aptamers.

[00346] Based upon the structure activity relationship (SAR) results of the from phase 1 of the optimization process, a second series of aptamers were designed, synthesized, purified and tested for binding to IL-23. In phase 2 optimization, comprised of ARC1539-ARC1545 (SEQ ID NOs 270-276), the data from phase 1 was used to generate more highly modified composite molecules using exclusively 2'-O methyl substitutions. For these and all subsequent molecules, the goal was to identify molecules that retained an affinity (K_D) of ~ 2 nM or better as well as an extent of binding at 100 nM (or 10 nM in phases 3 and 4) IL-23 of at least 50%. The best of these in terms of simple binding affinity was ARC1544 (SEQ ID NO 275).

[00347] In phase 3 of optimization, comprised of ARC1591-ARC1626 (SEQ ID NOs 277-312), the stability of the G-quartet structure of ARC979 (SEQ ID NO 177) was probed by assaying for IL-23 binding during systematic replacement of (deoxy guanosine) dG with deoxy inosine (dI). Since deoxy inosine lacks the exocyclic amine found in deoxy guanosine, a single amino to N7 hydrogen bond is removed from a potential G-quartet for each dG to dI

substitution. As seen from the data, only significant substitutions lead to substantial decreases in affinity for IL-23 suggesting that the aptamer structure is robust. Additionally, the addition of phosphorothioate containing residues into the ARC1544 (SEQ ID NO 275) context was evaluated (comprising ARC1620 to ARC1626 (SEQ ID NOs 306-312). As can be seen in Table 30 the affinities of ARC1620-1626 (SEQ ID NOs 306-312) were in fact improved relative to ARC979 (SEQ ID NO 177). Figure 17 depicts the binding curves for select ARC979 derivatives (ARC1624 and ARC1625) from the phase 3 optimization efforts, showing the remarkably improved binding affinities conferred by the inclusion of select phosphorothioate containing residues, compared to the parent molecule ARC979.

[00348] Phase 4 of optimization, comprised of ARC1755-1756 (SEQ ID NOs 313-314), involved only 2 sequences in an attempt to introduce more deoxy to 2'-O methyl substitutions and retain affinity. As can be seen with ARC1755 and 1756, these experiments were successful.

[00349] Unless noted otherwise, each of the sequences listed in Table 29 are in the 5' to 3' direction and may be derivatized with polyalkylene glycol ("PAG") moieties.

[00350] Table 29: Sequence information Phase 1-4 ARC979 optimization

SEQ ID NO	ARC #	Description	Sequence (5' -> 3'), (3T = inv dT), (T=dT), (s=phosphorothioate), (mN = 2'-O Methyl containing residue) (dI = deoxy Inosine containing residue)
224	ARC1386	ARC 979 with 3'-inv dT	dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGdGdGdG dAdGmUdGmCdGdGdGmCdGdGdGdGmUdGmU-3T
225	ARC1427	ARC979 opt phase 1	mAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGdGdGd GdAdGmUdGmCdGdGdGmCdGdGdGdGmUdGmU-3T
226	ARC1428	ARC979 opt phase 1	dAmCmAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGdGdGd GdAdGmUdGmCdGdGdGmCdGdGdGdGmUdGmU-3T
227	ARC1429	ARC979 opt phase 1	dAmCdAmGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGdGdGd GdAdGmUdGmCdGdGdGmCdGdGdGdGmUdGmU-3T
228	ARC1430	ARC979 opt phase 1	dAmCdAdGmGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGdGdGd GdAdGmUdGmCdGdGdGmCdGdGdGdGmUdGmU-3T
229	ARC1431	ARC979 opt phase 1	dAmCdAdGdGmCmAdAdGmUdAdAmUmUdGdGdGd GdAdGmUdGmCdGdGdGmCdGdGdGdGmUdGmU-3T
230	ARC1432	ARC979 opt phase 1	dAmCdAdGdGmCdAmAdGmUdAdAmUmUdGdGdGd GdAdGmUdGmCdGdGdGmCdGdGdGdGmUdGmU-3T

231	ARC14 33	ARC979 opt phase 1	dAmCdAdGdGmCdAdAmGmUdAdAmUmUdGdGdGd GdAdGmUdGmCdGdGdGmCdGdGdGdGmUdGmU-3T
232	ARC14 34	ARC979 opt phase 1	dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUmAdAmUmUdGdGdGd GdAdGmUdGmCdGdGdGmCdGdGdGdGmUdGmU-3T
233	ARC14 35	ARC979 opt phase 1	dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAmAmUmUdGdGdGd GdAdGmUdGmCdGdGdGmCdGdGdGdGmUdGmU-3T
234	ARC14 36	ARC979 opt phase 1	dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUmGdGdGd GdAdGmUdGmCdGdGdGmCdGdGdGdGmUdGmU-3T
235	ARC14 37	ARC979 opt phase 1	dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGmGdGd GdAdGmUdGmCdGdGdGmCdGdGdGdGmUdGmU-3T
236	ARC14 38	ARC979 opt phase 1	dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGdGmGd GdAdGmUdGmCdGdGdGmCdGdGdGdGmUdGmU-3T
237	ARC14 39	ARC979 opt phase 1	dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGdGdGm GdAdGmUdGmCdGdGdGmCdGdGdGdGmUdGmU-3T
238	ARC14 40	ARC979 opt phase 1	dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGdGdGdG mAdGmUdGmCdGdGdGmCdGdGdGdGmUdGmU-3T
239	ARC14 41	ARC979 opt phase 1	dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGdGdGdG dAmGmUdGmCdGdGdGmCdGdGdGdGmUdGmU-3T
240	ARC14 42	ARC979 opt phase 1	dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGdGdGdG dAdGmUmGmCdGdGdGmCdGdGdGdGmUdGmU-3T
241	ARC14 43	ARC979 opt phase 1	dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGdGdGdG dAdGmUdGmCmGdGdGmCdGdGdGdGmUdGmU-3T
242	ARC14 44	ARC979 opt phase 1	dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGdGdGdG dAdGmUdGmCdGmGdGmCdGdGdGdGmUdGmU-3T
243	ARC14 45	ARC979 opt phase 1	dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGdGdGdG dAdGmUdGmCdGdGmGmCdGdGdGdGmUdGmU-3T
244	ARC14 46	ARC979 opt phase 1	dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGdGdGdG dAdGmUdGmCdGdGdGmCmGdGdGdGmUdGmU-3T
245	ARC14 47	ARC979 opt phase 1	dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGdGdGdG dAdGmUdGmCdGdGdGmCdGmGdGdGmUdGmU-3T
246	ARC14 48	ARC979 opt phase 1	dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGdGdGdG dAdGmUdGmCdGdGdGmCdGdGmGdGmUdGmU-3T
247	ARC14 49	ARC979 opt phase 1	dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGdGdGdG dAdGmUdGmCdGdGdGmCdGdGdGmGmUdGmU-3T

122

248	ARC1450	ARC979 opt phase 1	dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGdGdGdG dAdGmUdGmCdGdGdGmCdGdGdGdGmUmGmU-3T
249	ARC1451	ARC979 opt phase 1	mAmCmAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGdGdGd GdAdGmUdGmCdGdGdGmCdGdGdGdGmUmGmU-3T
250	ARC1452	ARC979 opt phase 1	dAmCdAdGdGmCmAmAdGmUdAdAmUmUmGdGdGd GdAdGmUdGmCdGdGdGmCdGdGdGdGmUdGmU-3T
251	ARC1453	ARC979 opt phase 1	dAmCdA-s-dGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGdGdGdGdAdGmUdGmCdGdGdGmCdGdGdGdGmUdGmU-3T
252	ARC1454	ARC979 opt phase 1	dAmCdAdG-s-dGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGdGdGdGdAdGmUdGmCdGdGdGmCdGdGdGdGmUdGmU-3T
253	ARC1455	ARC979 opt phase 1	dAmCdAdGdG-s-mCdAdAdGmUdAdAmUmUdGdGdGdGdAdGmUdGmCdGdGdGmCdGdGdGdGmUdGmU-3T
254	ARC1456	ARC979 opt phase 1	dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdG-s-dGdGdGdAdGmUdGmCdGdGdGmCdGdGdGdGmUdGmU-3T
255	ARC1457	ARC979 opt phase 1	dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGdG-s-dGdGdAdGmUdGmCdGdGdGmCdGdGdGdGmUdGmU-3T
256	ARC1458	ARC979 opt phase 1	dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGdGdG-s-dGdAdGmUdGmCdGdGdGmCdGdGdGdGmUdGmU-3T
257	ARC1459	ARC979 opt phase 1	dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGdGdGdG dAdGmUdGmC-s-dGdGdGmCdGdGdGdGmUdGmU-3T
258	ARC1460	ARC979 opt phase 1	dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGdGdGdG dAdGmUdGmCdG-s-dGdGmCdGdGdGdGmUdGmU-3T
259	ARC1461	ARC979 opt phase 1	dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGdGdGdG dAdGmUdGmCdGdG-s-dGmCdGdGdGdGmUdGmU-3T
260	ARC1462	ARC979 opt phase 1	dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGdGdGdG dAdGmUdGmCdGdGdGmCdGdG-s-dGdGmUdGmU-3T
261	ARC1463	ARC979 opt phase 1	dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGdGdGdG dAdGmUdGmCdGdGdGmCdGdGdG-s-dGmUdGmU-3T
262	ARC1464	ARC979 opt phase 1	dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGdGdGdG dAdGmUdGmCdGdGdGmCdGdGdGdG-s-mUdGmU-3T
263	ARC1465	ARC979 opt phase 1	dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdA-s-dAmUmUdGdGdGdGdA-s-dG-s-mU-s-dG-s-

123

			mCdGdGdG-s-mCdGdGdGdGmUdGmU-3T
264	ARC14 66	ARC979 opt phase 1	dAmCdAPEGdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGdGd GdGdAdGmUdGmCdGdGdGmCdGdGdGdGPEGmUdG mU-3T
265	ARC14 67	ARC979 opt phase 1	mCmGmCdAPEGdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdG dGdGdGdAdGmUdGmCdGdGdGmCdGdGdGdGPEGm UdGmCmG-3T
266	ARC14 68	ARC979 opt phase 1	dGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGdGdGdGdAdGmU dGmCdGdGdGmCdGdGdGdG-3T
267	ARC14 69	ARC979 opt phase 1	dGdGmCmAmAdGmUdAdAmUmUmGdGdGdGdAdGm UdGmCdGdGdGmCdGdGdGdG-3T
268	ARC14 70	ARC979 opt phase 1	dGdGmCdAdAdGmUdA-s-dAmUmUdGdGdGdGdA-s-dG-s-mU-s-dG-s-mCdGdGdG-s-mCdGdGdGdG-3T
269	ARC14 71	ARC979 opt phase 1	dGdGmCmAmAdGmUdA-s-dAmUmUmGdGdGdGdA-s-dG-s-mU-s-dG-s-mCdGdGdG-s-mCdGdGdGdG-3T
270	ARC15 39	ARC979 opt phase 2	mAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGdGdGd GdAdGmUdGmCdGdGdGmCdGdGdGdGmUmGmU-3T
271	ARC15 40	ARC979 opt phase 2	dAmCdAdGdGmCdAmAmGmUmAdAmUmUdGdGdGd GdAdGmUdGmCdGdGdGmCdGdGdGdGmUdGmU-3T
272	ARC15 41	ARC979 opt phase 2	dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGdGdGm GmAmGmUmGmCdGdGdGmCdGdGdGdGmUdGmU-3T
273	ARC15 42	ARC979 opt phase 2	dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGdGdGdG dAdGmUdGmCdGdGmGmCmGmGdGdGmUdGmU-3T
274	ARC15 43	ARC979 opt phase 2	mAmCdAdGdGmCdAmAmGmUmAdAmUmUdGdGdG mGmAmGmUmGmCdGdGmGmCmGmGdGdGmUmG mU-3T
275	ARC15 44	ARC979 opt phase 2	dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGmGmGd GdAdGmUdGmCmGmGdGmCdGdGmGmGmUdGmU-3T
276	ARC15 45	ARC979 opt phase 2	mAmCdAdGdGmCdAmAmGmUmAdAmUmUdGmGm GmGmAmGmUmGmCmGmGmGmCmGmGmGmGmU mGmU-3T
277	ARC15 91	ARC979 opt phase 3	dAmCdAdIdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGdGdGdGd AdGmUdGmCdGdGdGmCdGdGdGdGmUdGmU-3T
278	ARC15 92	ARC979 opt phase 3	dAmCdAdGdImCdAdAdGmUdAdAmUmUdGdGdGdGd AdGmUdGmCdGdGdGmCdGdGdGdGmUdGmU-3T

124

279	ARC1593	ARC979 opt phase 3	dAmCdAdIdImCdAdAdGmUdAdAmUmUdGdGdGdGd AdGmUdGmCdGdGdGmCdGdGdGdGmUdGmU-3T
280	ARC1594	ARC979 opt phase 3	dAmCdAdGdGmCdAdAdImUdAdAmUmUdGdGdGdGd AdGmUdGmCdGdGdGmCdGdGdGdGmUdGmU-3T
281	ARC1595	ARC979 opt phase 3	dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdIdGdGdGd AdGmUdGmCdGdGdGmCdGdGdGdGmUdGmU-3T
282	ARC1596	ARC979 opt phase 3	dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGdIdGdGd AdGmUdGmCdGdGdGmCdGdGdGdGmUdGmU-3T
283	ARC1597	ARC979 opt phase 3	dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGdGdIdGd AdGmUdGmCdGdGdGmCdGdGdGdGmUdGmU-3T
284	ARC1598	ARC979 opt phase 3	dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGdGdGdId AdGmUdGmCdGdGdGmCdGdGdGdGmUdGmU-3T
285	ARC1599	ARC979 opt phase 3	dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdIdIdGdGd AdGmUdGmCdGdGdGmCdGdGdGdGmUdGmU-3T
286	ARC1600	ARC979 opt phase 3	dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGdIdIdGd AdGmUdGmCdGdGdGmCdGdGdGdGmUdGmU-3T
287	ARC1601	ARC979 opt phase 3	dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGdGdIdId AdGmUdGmCdGdGdGmCdGdGdGdGmUdGmU-3T
288	ARC1602	ARC979 opt phase 3	dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdIdIdIdIdAd GmUdGmCdGdGdGmCdGdGdGdGmUdGmU-3T
289	ARC1603	ARC979 opt phase 3	dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGdGdGdG dAdImUdGmCdGdGdGmCdGdGdGdGmUdGmU-3T
290	ARC1604	ARC979 opt phase 3	dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGdGdGdG dAdGmUdImCdGdGdGmCdGdGdGdGmUdGmU-3T
291	ARC1605	ARC979 opt phase 3	dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGdGdGdG dAdGmUdGmCdIdGdGmCdGdGdGdGmUdGmU-3T
292	ARC1606	ARC979 opt phase 3	dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGdGdGdG dAdGmUdGmCdGdIdGmCdGdGdGdGmUdGmU-3T
293	ARC1607	ARC979 opt phase 3	dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGdGdGdG dAdGmUdGmCdGdGdImCdGdGdGdGmUdGmU-3T
294	ARC1608	ARC979 opt phase 3	dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGdGdGdG dAdGmUdGmCdIdIdGmCdGdGdGdGmUdGmU-3T
295	ARC1609	ARC979 opt phase 3	dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGdGdGdG dAdGmUdGmCdGdIdImCdGdGdGdGmUdGmU-3T

125

296	ARC16 10	ARC979 opt phase 3	dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGdGdGdG dAdGmUdGmCdIdIdImCdGdGdGdGmUdGmU-3T
297	ARC16 11	ARC979 opt phase 3	dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGdGdGdG dAdGmUdGmCdGdGdGmCdIdGdGdGmUdGmU-3T
298	ARC16 12	ARC979 opt phase 3	dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGdGdGdG dAdGmUdGmCdGdGdGmCdGdIdGdGmUdGmU-3T
299	ARC16 13	ARC979 opt phase 3	dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGdGdGdG dAdGmUdGmCdGdGdGmCdGdGdIdGmUdGmU-3T
300	ARC16 14	ARC979 opt phase 3	dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGdGdGdG dAdGmUdGmCdGdGdGmCdGdGdGdImUdGmU-3T
301	ARC16 15	ARC979 opt phase 3	dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGdGdGdG dAdGmUdGmCdGdGdGmCdIdIdGdGmUdGmU-3T
302	ARC16 16	ARC979 opt phase 3	dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGdGdGdG dAdGmUdGmCdGdGdGmCdGdIdIdGmUdGmU-3T
303	ARC16 17	ARC979 opt phase 3	dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGdGdGdG dAdGmUdGmCdGdGdGmCdGdGdIdImUdGmU-3T
304	ARC16 18	ARC979 opt phase 3	dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGdGdGdG dAdGmUdGmCdGdGdGmCdIdIdIdmUdGmU-3T
305	ARC16 19	ARC979 opt phase 3	dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGdGdGdG dAdGmUdGmCdGdGdGmCdGdGdGdGmUdImU-3T
306	ARC16 20	ARC979 opt phase 3	dAmC-s-dAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGmGmGdGdAd GmUdGmCmGmGdGmCdGdGmGmGmUdGmU-3T
307	ARC16 21	ARC979 opt phase 3	dAmCdA-s-dG-s-dGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGmGmGdGdAdGmUd GmCmGmGdGmCdGdGmGmGmUdGmU-3T
308	ARC16 22	ARC979 opt phase 3	dAmCdAdGdGmC-s-dA-s-dA-s-dGmU-s-dA-s-dAmUmU-s-dGmGmGdGdAdGmUdGmCmGmGdGmCdGdGmGmGmUdGmU-3T
309	ARC16 23	ARC979 opt phase 3	dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGmGmG-s-dG-s-dA-s-dGmU-s-dGmCmGmGdGmCdGdGmGmGmUdGmU-3T
310	ARC16 24	ARC979 opt phase 3	dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGmGmGdGdAdGmUdGmCmGmG-s-dGmC-s-dG-s-dGmGmGmUdGmU-3T
311	ARC16 25	ARC979 opt phase 3	dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGmGmGdGdAdGmUdGmCmGmGdGmCdGdGmGmGmU-s-

			dGmU-3T
312	ARC1626	ARC979 opt phase 3	dAmC-s-dA-s-dG-s-dGmC-s-dA-s-dA-s-dGmU-s-dA-s-dAmUmU-s-dGmGmG-s-dG-s-dA-s-dGmU-s-dGmCmGmG-s-dGmC-s-dG-s-dGmGmGmU-s-dGmU-3T
313	ARC1755	ARC979 opt phase 4	mAmC-s-dAdGdGmC-s-dAmAmGmUmA-s-dAmUmU-s-dGmGmGmGmAmGmUmGmCmGmGmGmCmGmGmGmGmUmGmU-3T
314	ARC1756	ARC979 opt phase 4	mAmC-s-dAdGdGmC-s-dAmAmGmUmA-s-dAmUmU-s-dGmGmG-s-dG-s-dA-s-dGmU-s-dGmCmGmGmGmCmGmGmGmGmUmGmU-3T

[00351] Table 30: Binding Characterization

SEQ ID NO	ARC #	Description	K_D (nM)	% binding at 100 nM (through ARC1619) or at 10 nM (ARC1620 - 1756)
224	ARC1386	ARC 979 with 3'-inv dT	1	69.9
225	ARC1427	ARC979 opt phase 1	3.0	49.4
226	ARC1428	ARC979 opt phase 1	1.8	57.8
227	ARC1429	ARC979 opt phase 1	29.5	48.4
228	ARC1430	ARC979 opt phase 1	14.2	51.6
229	ARC1431	ARC979 opt phase 1	10.0	56.3
230	ARC1432	ARC979 opt phase 1	3.8	57.9
231	ARC1433	ARC979 opt phase 1	2.8	55.2

232	ARC1434	ARC979 opt phase 1	3.0	52.9
233	ARC1435	ARC979 opt phase 1	9.8	51.2
234	ARC1436	ARC979 opt phase 1	15.1	46.9
235	ARC1437	ARC979 opt phase 1	3.9	43.1
236	ARC1438	ARC979 opt phase 1	6.0	36.7
237	ARC1439	ARC979 opt phase 1	4.8	43.5
238	ARC1440	ARC979 opt phase 1	6.7	54.9
239	ARC1441	ARC979 opt phase 1	2.7	49.8
240	ARC1442	ARC979 opt phase 1	2.8	60.5
241	ARC1443	ARC979 opt phase 1	2.0	52.8
242	ARC1444	ARC979 opt phase 1	4.4	58.1
243	ARC1445	ARC979 opt phase 1	2.8	56.3
244	ARC1446	ARC979 opt phase 1	2.1	55.0
245	ARC1447	ARC979 opt phase 1	2.5	56.5
246	ARC1448	ARC979 opt phase 1	2.3	59.5
247	ARC1449	ARC979 opt phase 1	2.6	48.4
248	ARC1450	ARC979 opt phase 1	2.6	46.5
249	ARC1451	ARC979 opt phase 1	10.2	46.1
250	ARC1452	ARC979 opt phase 1	18.9	56.9
251	ARC1453	ARC979 opt	4.4	65.0

		phase 1		
252	ARC1454	ARC979 opt phase 1	2.7	61.6
253	ARC1455	ARC979 opt phase 1	1.6	56.6
254	ARC1456	ARC979 opt phase 1	3.2	55.5
255	ARC1457	ARC979 opt phase 1	3.0	56.1
256	ARC1458	ARC979 opt phase 1	2.9	49.6
257	ARC1459	ARC979 opt phase 1	4.0	50.7
258	ARC1460	ARC979 opt phase 1	5.8	46.1
259	ARC1461	ARC979 opt phase 1	3.7	47.3
260	ARC1462	ARC979 opt phase 1	1.7	53.4
261	ARC1463	ARC979 opt phase 1	3.6	53.5
262	ARC1464	ARC979 opt phase 1	2.4	54.6
263	ARC1465	ARC979 opt phase 1	1.3	57.0
264	ARC1466	ARC979 opt phase 1	1.9	38.7
265	ARC1467	ARC979 opt phase 1	1.7	57.0
266	ARC1468	ARC979 opt phase 1	10.0	49.8
267	ARC1469	ARC979 opt phase 1	49.8	59.8
268	ARC1470	ARC979 opt phase 1	8.6	61.0
269	ARC1471	ARC979 opt phase 1	23.5	62.9
270	ARC1539	ARC979 opt phase 2	6.6	43.8

271	ARC1540	ARC979 opt phase 2	7.5	50.3
272	ARC1541	ARC979 opt phase 2	3.9	57.0
273	ARC1542	ARC979 opt phase 2	1.2	57.6
274	ARC1543	ARC979 opt phase 2	5.9	40.9
275	ARC1544	ARC979 opt phase 2	0.9	58.6
276	ARC1545	ARC979 opt phase 2	0.4 & 62.0 (the binding curve was strongly biphasic)	17.4 & 20.9
277	ARC1591	ARC979 opt phase 3		54.8
278	ARC1592	ARC979 opt phase 3	8.1	54.4
279	ARC1593	ARC979 opt phase 3	13.8	51.0
280	ARC1594	ARC979 opt phase 3	4.2	60.1
281	ARC1595	ARC979 opt phase 3	5.4	53.9
282	ARC1596	ARC979 opt phase 3	11.1	59.0
283	ARC1597	ARC979 opt phase 3	11.2	61.3
284	ARC1598	ARC979 opt phase 3	4.7	61.0
285	ARC1599	ARC979 opt phase 3	7.2	57.7
286	ARC1600	ARC979 opt phase 3	15.6	61.3
287	ARC1601	ARC979 opt phase 3	4.4	58.6
288	ARC1602	ARC979 opt phase 3	40.8	64.4

289	ARC1603	ARC979 opt phase 3	1.6	64.2
290	ARC1604	ARC979 opt phase 3	2.1	50.2
291	ARC1605	ARC979 opt phase 3	7.5	56.8
292	ARC1606	ARC979 opt phase 3	5.0	60.3
293	ARC1607	ARC979 opt phase 3	3.3	61.5
294	ARC1608	ARC979 opt phase 3	9.7	61.1
295	ARC1609	ARC979 opt phase 3	4.7	60.5
296	ARC1610	ARC979 opt phase 3	5.2	60.4
297	ARC1611	ARC979 opt phase 3	1.7	62.1
298	ARC1612	ARC979 opt phase 3	1.9	60.9
299	ARC1613	ARC979 opt phase 3	2.3	58.4
300	ARC1614	ARC979 opt phase 3	1.7	60.5
301	ARC1615	ARC979 opt phase 3	5.8	55.2
302	ARC1616	ARC979 opt phase 3	6.1	59.5
303	ARC1617	ARC979 opt phase 3	4.1	61.9
304	ARC1618	ARC979 opt phase 3	34.0	67.0
305	ARC1619	ARC979 opt phase 3	2.8	52.1
306	ARC1620	ARC979 opt phase 3	0.4	68.0
307	ARC1621	ARC979 opt phase 3	0.5	64.6
308	ARC1622	ARC979 opt	0.3	66.0

		phase 3		
309	ARC1623	ARC979 opt phase 3	0.2	68.7
310	ARC1624	ARC979 opt phase 3	0.4	68.0
311	ARC1625	ARC979 opt phase 3	0.4	75.0
312	ARC1626	ARC979 opt phase 3	0.1	79.2
313	ARC1755	ARC979 opt phase 4	0.8	31
314	ARC1756	ARC979 opt phase 4	0.5	56

*30min RT incubation for K_D determination
*1X Dulbecco's PBS (with Ca^{++} and Mg^{++}) +0.1mg/mL BSA reaction buffer

EXAMPLE 2C: Plasma stability of anti-IL-23 aptamers

[00352] A subset of the aptamers identified during the optimization process was assayed for nuclease stability in human plasma. Plasma nuclease degradation was measured using denaturing polyacrylamide gel electrophoresis as described below. Briefly, for plasma stability determination, chemically synthesized aptamers were purified using denaturing polyacrylamide gel electrophoresis, 5'end labeled with γ-^{32}P ATP and then gel purified again. Trace ^{32}P labeled aptamer was incubated in the presence of 100 nM unlabeled aptamer in 95% human plasma in a 200 microliter binding reaction. The reaction for the time zero point was made separately with the same components except that the plasma was replaced with PBS to ensure that the amount of radioactivity loaded on gels was consistent across the experiment. Reactions were incubated at 37 °C in a thermocycler for the 1, 3, 10, 30 and 100 hours. At each time point, 20 microliters of the reaction was removed, combined with 200 microliters of formamide loading dye and flash frozen in liquid nitrogen and stored at -20 °C. After the last time point was taken, frozen samples were thawed and 20 microliters was removed from each time point. SDS was then added to the small samples to a final concentration of 0.1%. The samples were then incubated at 90 °C for 10 – 15 minutes and loaded directly onto a 15% denaturing PAGE gel and run at 12 W for 35 minutes. Radioactivity on the gels was quantified using a Storm 860 Phosphorimager system

(Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). The percentage of full length aptamer at each time point was determined by quantifying the full length aptamer band and dividing by the total counts in the lane. The fraction of full length aptamer at each time-point was then normalized to the percentage full length aptamer of the 0 hour time-point. The fraction of full length aptamer as a function of time was fit to the equation:

m1*e^(-m2*m0)

where m1 is the maximum % full length aptamer (m1=100); and m2 is the rate of degradation.

The half-life of the aptamer ($T_{1/2}$) is equal to the (ln 2) / m2.

[00353] Sample data is shown in Figure 18 and the results for the aptamers tested are summarized in Table 31.

[00354] Table 31: plasma stability

SEQ ID NO	ARC #	Description	~T1/2 in human plasma (hrs)
177	ARC979		14
224	ARC1386	ARC 979 with 3'-inv dT	33
307	ARC1621	ARC979 opt phase 3	59
308	ARC1622	ARC979 opt phase 3	54
309	ARC1623	ARC979 opt phase 3	45
310	ARC1624	ARC979 opt phase 3	35
311	ARC1625	ARC979 opt phase 3	31
312	ARC1626	ARC979 opt phase 3	113
313	ARC1755	ARC979 opt phase 4	83
314	ARC1756	ARC979 opt phase 4	96

EXAMPLE 3: FUNCTIONAL CELL ASSAYS

Cell-based assay and minimization of active rRfY IL-23 aptamers

[00355] IL-23 plays a role in JAK/STAT signal transduction and phosphorylates STAT 1, 3, 4, and 5. To test whether IL-23 aptamers showed cell-based activity, signal transduction was assayed in the lysates of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) grown in media containing PHA (Phytohemagglutinin), or PHA Blasts. More specifically, the cell-based assay determined whether IL-23 aptamers could inhibit IL-23 induced STAT-3 phosphorylation in PHA Blasts.

[00356] In essence, lysates of IL-23 treated cells will contain more activated STAT3 than quiescent or aptamer blocked cells. Inhibition of IL-23-induced STAT3 phosphorylation was measured by two methods: by western blot, using an anti-phospho-STAT3 Antibody (Tyr705) (Cell Signaling, Beverly, MA); and by TransAM™ Assay (Active Motif, Carlsbad, CA). The TransAM™ assay kit provides a 96 well plate on which an oligonucleotide containing the STAT consensus binding site (5'TTCCCGGAA-3') is immobilized. An anti-STAT3 antibody that recognizes an epitope on STAT3 that is only accessible when STAT3 is activated is used in conjunction with an HRP-conjugated secondary antibody to give a colorimetric readout that can be quantified by spectrophotometry. (See Figure 19).

[00357] In summary, the cell-based assay was conducted by isolating the peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from whole blood using a Histopaque gradient (Sigma, St. Louis, MO). The PBMCs were cultured for 3 to 5 days at 37°C/5% CO_2 in Peripheral Blood Medium (Sigma) which contains PHA, supplemented with IL-2 (100 units/mL) (R&D Systems, Minneapolis, MN), to generate PHA Blasts. To test IL-23 aptamers, the PHA Blasts were washed twice with 1X PBS, then serum starved for four hours in RPMI, 0.20 % FBS. After serum starvation, approximately 2 million cells were aliquotted into appropriately labeled eppendorf tubes. hIL-23 at a final constant concentration of 3 ng/mL (R&D Systems, Minneapolis, MN) was combined with a dilution series of various IL-23 aptamers as described in Example 1, and the cytokine/aptamer mixture was added to the aliquotted cells in a final volume of 100 µl and incubated at 37°C for 10-12 minutes. The incubation reaction was stopped by adding 1 mL of ice-cold PBS with 1.5 mM Na_3VO_4. Cell lysates were made

using the lysis buffer provided by the TransAM™ STAT 3 assay following the manufacturer's instructions. Figure 20 depicts a flow summary of the protocol used for the cell based assay.

[00358] Parent aptamer and minimized IL-23 aptamers from the various selections with 2'-F pyrimidines-containing pools (rRfY), ribo/2'O-Me containing pools (rRmY), deoxy/2'O-Me containing pools (dRmY), and optimized dRmY aptamers were tested using the TransAM™ method.

Example 3A: Cell Based Assay Results for parent and minimized clones from rRfY selections

[00359] Full length clones from the rRfY selection described in Example 1A, and select minimized rRfY clones that were described in Example 2A.1, were tested using the TransAM™ STAT3 activation assay. Table 34 summarizes the cell based assay data for IL-23 full length aptamers generated from the rRfY selections described in Example 1A. Table 35 summarizes the activity data of the rRfY minimized clones, described in Example 2A.1, each compared to the activity of their respective parent (full length) clone. The minimized rRfY clones F11min2 (SEQ ID NO 147), A10min5 (SEQ ID NO 139), A10min6 (SEQ ID NO 140), B10min4 (SEQ ID NO 144), B10min5 (SEQ ID NO 145), Type1.4 (SEQ ID NO 151) and Type1.5 (SEQ ID NO 152) each outperformed their respective parent clones (see Figure 21), in addition to all of the full length rRfY clones when tested in the TransAM™ STAT3 activation assay.

[00360] Table 34: Cell Based Assay Results: Summary of rRfY Clones Tested

SEQ ID NO	Clone Name	selection	Western Blot	TransAM	TransAM IC_{50}
27	AMX86-C5	R8 h-IL-23	Yes	Yes	3 μM
13	AMX86-D5	R8 h-IL-23	Yes	Yes	> 5 μM
16	AMX86-D6	R8 h-IL-23	Yes	Yes	> 5 μM
24	AMX86-E6	R8 h-IL-23	Yes	No	

135

22	AMX86-F6	R8 h-IL-23	Yes	No	
18	AMX86-A7	R8 h-IL-23	Yes	No	
25	AMX86-H7	R8 h-IL-23	Yes	No	
35	AMX86-B9	R8 X-IL-23	Yes	No	
32	AMX86-C9	R8 X-IL-23	Yes	No	
33	AMX86-G9	R8 X-IL-23	Yes	No	
39	AMX86-H9	R8 X-IL-23	Yes	Yes	250 nM
28	AMX86-B10	R8 X-IL-23	Yes	Yes	800 nM
36	AMX86-G10	R8 X-IL-23	Yes	Yes	~2 μM
37	AMX86-A11	R8 X-IL-23	Yes	No	
30	AMX86-D11	R8 X-IL-23	Yes	No	
43	AMX84-A10	R10 PN-IL-23	Yes	Yes	400 nM
44	AMX84-B10	R10 PN-IL-23	Yes	Yes	> 1 μM
45	AMX84-A11	R10 PN-IL-23	Yes	Yes	> 5 μM
46	AMX84-F11	R10 PN-IL-23	Yes	Yes	250 nM
47	AMX84-E12	R10 PN-IL-23	Yes	Yes	> 1 μM
48	AMX84-C10	R10 PN-IL-23	No	Yes	250 nM
49	AMX84-C11	R10 PN-IL-23	No	Yes	800 nM
50	AMX84-G11	R10 PN-IL-23	No	Yes	250 nM
51	ARX83-plate1-	R12 PN-IL23	No	Yes	> 5 μM

136

	H1				
52	AMX91-F11	R10 PN-IL-23	No	Yes	5 μM
53	AMX91-G1	R10 PN-IL-23	No	Yes	2 μM
54	AMX91-E3	R10 PN-IL-23	No	Yes	> 5 μM
55	AMX91-H3	R10 PN-IL-23	No	Yes	50 nM
64	AMX91-G11	R12 PN-IL23	No	Yes	3 μM
65	AMX91-C12	R12 PN-IL23	No	Yes	50 nM
66	AMX91-H12	R12 PN-IL23	No	Yes	350 nM
56	AMX91-B5	R10 PN-IL-23	No	Yes	1 μM
57	AMX91-A6	R10 PN-IL-23	No	Yes	3 μM
58	AMX91-G7	R12 PN-IL23	No	Yes	150 nM
59	AMX91-H7	R12 PN-IL23	No	Yes	50 nM
60	AMX91-B8	R12 PN-IL23	No	Yes	450 nM
61	AMX91-H8	R12 PN-IL23	No	Yes	3 μM
62	AMX91-G9	R12 PN-IL23	No	Yes	50 nM
63	AMX91-D9	R12 PN-IL23	No	Yes	150 nM

[00361] Table 35: IL-23 2'F rRfY Minimized aptamer binding compared to parent aptamers.

SEQ ID NO	Clone Name	Selection	W.Blot	TransAM	IC_{50} minimer	IC_{50} Full Length
147	F11min2	R10 PN-IL-23	No	Yes	25 nM	250 Nm

139	A10min5	R10 PN-IL-23	No	Yes	300 nM	1 μM
140	A10min6	R10 PN-IL-23	No	Yes	250 nM	1 μM
144	B10min4	R10 PN-IL-23	No	Yes	500 nM	700 nM
145	B10min5	R10 PN-IL-23	No	Yes	80 nM	700 nM
151	Type1.4	N/A	No	Yes	80 nM	N/A
152	Type1.5	N/A	No	Yes	80 nM	N/A

Example 3B: Cell Based Assay Results for parent and minimized clones from first dRmY selections

[00362] Parent clones from the dRmY selection described in Example 1C, and minimized dRmY clones from this selection (described in Example 2A.2), were tested for activity using the TransAM™ STAT3 activation assay. The three full length dRmY clones described in Example 1C which showed the highest binding affinity for IL-23, ARC489 (SEQ ID NO 91), ARC490 (SEQ ID NO 92), ARC491 (SEQ ID NO 94) were tested. ARC 492 (SEQ ID NO 97) which exhibited no binding to IL-23 was used as a negative control. ARC489 (SEQ ID NO 91), and ARC491 (SEQ ID NO 94) showed comparable cell based activity in the TransAM™ STAT3 activation assay and preliminary data indicate IC_{50}'s in the 50 nM-500 nM range (data not shown).

[00363] The only minimized clone from the dRmY minimization efforts described in Example 2A.2 which showed binding to IL-23, ARC527 (SEQ ID NO 159), was tested in the TransAM™ STAT3 activation assay and showed a decrease in assay activity compared to its respective full length ARC489 (SEQ ID NO 91) (data not shown).

Example 3C: Cell Based Assay Results for parent and minimized clones from second dRmY selections

[00364] Parent clones from the dRmY selection described in Example 1D, and minimized clones from this selection (described in Example 2A.3) that displayed high affinity to hIL-23 were screened for functionality in the TransAM™ assay using an 8-point IL-23 titration from

0 to 3 μM in 3 fold dilutions in combination with a constant IL-23 concentration of 3 ng/mL. IC_{50}s for the full length clones were calculated from the dose response curves. Figure 22 is an example of the dose response curves for the dRmY clones from the selection described in Example 1D that displayed potent cell based activity in the TransAM™ assay (ARC611 (SEQ ID NO 103), ARC614 (SEQ ID NO 105), ARC621 (SEQ ID NO 108), and ARC627 (SEQ ID NO 110)).

[00365] Minimized dRmY clones (described in Example 2A.3) were screened for functionality and compared to their respective parent clone in the in the TransAM™ assay. IC_{50}s were calculated from the dose response curves. Figure 23 is an example of the dose response curves for some the more potent minimized dRmY clones, ARC979 (SEQ ID NO 177), ARC980 (SEQ ID NO 178), ARC982 (SEQ ID NO 180), compared to the parent full length clones, ARC621 (SEQ ID NO 108) and ARC627 (SEQ ID NO 110). ARC979 (SEQ ID NO 177) consistently performed the best in the TransAM™ assay, with an IC_{50} of 40 nM +/- 10 nM when averaged over the course of three experiments. ARC792 (SEQ ID NO 162), ARC794 (SEQ ID NO 164), ARC795 (SEQ ID NO 165) also displayed potent activity in the TransAM™ assay.

Example 3D: Cell Based Assay Results for Optimized ARC979 Derivatives

[00366] Several of the optimized ARC979 derivatives described in Example 2B.2 that displayed high affinity to hIL-23 were screened for their ability to inhibit IL-23 induced STAT 3 activation using the PHA Blast assay previously described. Inhibition of IL-23-induced STAT3 phosphorylation was measured using the Pathscan® Phospho-STAT3 (Tyr705) Sandwich ELISA Kit (Cell Signaling Technology, Beverly, MA).

[00367] Similar to the TransAM™ Assay method previously described, the Pathscan® Phospho-STAT3 (Tyr705) Sandwich ELISA Kit detects endogenous levels of Phospho-STAT3 (Tyr705) protein by using a STAT3 rabbit monoclonal antibody which has been coated onto the wells of a 96-well plate. After incubation with cell lysates, both nonphospho- and phospho-STAT3 proteins are captured by the coated antibody. A phospho-STAT3 mouse monoclonal antibody is added to detect the captured phospho-STAT3 protein, and an HRP-linked anti-mouse antibody is then used to recognize the bound detection antibody. HRP substrate, TMB, is added to develop color, and the magnitude of optical density for this developed color is proportional to the quantity of phospho-STAT3 protein.

[00368] PHA Blasts were isolated and prepared as described above and treated with hIL-23 at a final constant concentration of 6 ng/mL (R&D Systems, Minneapolis, MN) to induce STAT3 activation, instead of using 3 ng/mL as previously described with the TransAM™ assay. Several clones from the selection described in 2C, were screened by using a 6-point IL-23 titration from 0 to 700nM in 3 fold dilutions in combination with a constant IL-23 concentration of 6 ng/mL of IL-23 (R&D Systems, Minneapolis, MN) to induce STAT3 activation, instead of using 3 ng/mL as previously described with the TransAM™ assay. Lysates of treated cells were prepared using the buffers provided by the Pathscan kit, and the assay was run according to the manufacturer's instructions. IC_{50}s for the full length clones were calculated from the dose response curves.

[00369] ARC979, which displayed an IC_{50} of 40 +/-10 nM using the TransAM™ method, consistently displayed an IC_{50} of 6 +/- 1 nM using the Pathscan® method. As previously mentioned this IC_{50} value is consistent with the K_D value for ARC979 of 1 nM which was repeatedly verified under the direct binding assay conditions described in Example 2B.2. As can be seen from the Table 36, several of the optimized derivatives of ARC979 remarkably displayed even higher potency than ARC979 when directly compared using the Pathscan® Method, particularly ARC1624 and ARC1625, which gave IC_{50} values of 2 nM and 4 nM respectively.

[00370] Figure 24 is an example of the dose response curves for several of the optimized clones that displayed both high affinity for IL-23 and potent cell based activity in the Pathscan® assay. Table 36 summarizes the IC_{50}'s derived from the dose response curves for the optimized aptamers tested.

[00371] Table 36: IC_{50}s for Optimized ARC979 derivatives in the Pathscan® Assay

SEQ ID NO	Clone	Pathscan® IC_{50} (nM)
177	979	6 +/- 1
275	1544	____
308	1622	9

309	1623	5
310	1624	2
311	1625	4
312	1626	12
313	1755	68
314	1756	19

Example 3E: Cell based assay results for parent and minimized clones from the mouse IL-23 selections

[00372] Using the PHA Blast assay and the TransAM™ method described above, mouse IL-23 was shown to activate STAT3 in human PHA blasts (See Figure 25). Therefore, the ability of the parent clones from the mouse IL-23 selection described in Example 1E, and minimized clones from this selection (described in Example 2A.4) that displayed affinity to mIL-23 to block mouse IL-23 induced STAT3 activation in human PHA blast cells was measured using the TransAM™ assay. The protocol used was identical to that previously described except mouse IL-23 was used to induce STAT 3 activation in PHA Blasts at a concentration of 30 ng/mL, instead of using human IL-23 at a concentration of 3 ng/mL. The results for the parent clones are listed in Table 37 and the results for the minimized clones are listed in Table 38 below.

[00373] Table 37: Parent mIL-23-rRfY Clone Activity in the TransAM™ Assay

SEQ ID NO	Clone Name	Selection	IC_{50} (nM)
124	ARC1628	R7 mIL-23	37
125	ARC1629	R7 mIL-23	Not Tested
126	ARC1630	R7 mIL-23S	16.6*
127	ARC1631	R7 mIL-23S	Not Tested
128	ARC1632	R7 mIL-23S	18
129	ARC1633	R7 mIL-23S	31
130	ARC1634	R7 mIL-23S	9

147

*Multiple experiment average.

[00374] Table 38: Mouse IL-23 rRfY Minimized Clone Activity in the TransAM™ Assay

Minimized Clone SEQ ID NO	Parent Clone	IC_{50} mIL-23 (nM)
199	ARC1628	18 nM
200	ARC1632	inactive
201	ARC1633	7
202	ARC1634	26

The invention having now been described by way of written description and example, those of skill in the art will recognize that the invention can be practiced in a variety of embodiments and that the description and examples above are for purposes of illustration and not limitation of the following claims.

What is claimed is:

1) An aptamer that specifically binds to IL-23.

2) The aptamer of claim 1, wherein IL-23 is a variant of IL-23 that performs a biological function that is essentially the same as a function of IL-23.

3) The aptamer of claim 2 wherein the variant of IL-23 has substantially the same structure and substantially the same ability to bind said aptamer as that of IL-23.

4) The aptamer of claim 3, wherein IL-23 or a variant thereof comprises an amino acid sequence that is at least 70% identical to a sequence comprising SEQ ID NOs 4 and 5.

5) The aptamer of claim 3, wherein IL-23 or a variant thereof comprises an amino acid sequence that is at least 80% identical to a sequence comprising SEQ ID NOs 4 and 5.

6) The aptamer of claim 3, wherein IL-23 or a variant thereof comprises an amino acid sequence that is at least 90% identical to a sequence comprising SEQ ID NOs 4 and 5.

7) The aptamer of claim 3, wherein IL-23 or a variant thereof has an amino acid sequence comprising SEQ ID NOs 4 and 5.

8) The aptamer of claim 7, wherein the aptamer is ribonucleic acid.

9) The aptamer of claim 8, wherein the aptamer is single stranded ribonucleic acid.

10) The aptamer of claim 7, wherein the aptamer is deoxyribonucleic acid.

11) The aptamer of claim 10, wherein the aptamer is single stranded deoxyribonucleic acid.

12) The aptamer of claim 7, wherein the aptamer has a dissociation constant for IL-23 or a variant thereof of about 100 nM or less.

13) The aptamer of claim 12, wherein the aptamer has a dissociation constant for IL-23 or a variant thereof of about 50 nM or less.

14) The aptamer of claim 13, wherein the aptamer has a dissociation constant for human IL-23 or a variant thereof of about 10 nM or less.

15) The aptamer of claim 14, wherein the aptamer has a dissociation constant for human IL-23 or a variant thereof of about 1 nM or less.

143

16) An aptamer of claim 7, wherein the aptamer comprises at least one chemical modification.

17) The aptamer of claim 16, wherein the modification is selected from the group consisting: of a chemical substitution at a sugar position; a chemical substitution at a phosphate position; and a chemical substitution at a base position, of the nucleic acid.

18) The aptamer of claim 16, wherein the modification is selected from the group consisting of: incorporation of a modified nucleotide; 3' capping; conjugation to a high molecular weight, non-immunogenic compound; conjugation to a lipophilic compound; and phosphate backbone modification.

19) The aptamer of claim 18, wherein the non-immunogenic, high molecular weight compound is polyalkylene glycol.

20) The aptamer of claim 19, wherein the polyalkylene glycol is polyethylene glycol.

21) The aptamer of claim 18, wherein the backbone modification comprises incorporation of one or more phosphorothioates into the phosphate backbone.

22) The aptamer of claim 21, wherein the aptamer comprises the incorporation of fewer than 10 phosphorothioates in the phosphate backbone.

23) The aptamer of claim 22, wherein the aptamer comprises the incorporation of fewer than 6 phosphorothioates in the phosphate backbone.

24) The aptamer of claim 23, wherein the aptamer comprises the incorporation of fewer than 3 phosphorothioates in the phosphate backbone.

25) The aptamer of claim 7, wherein the aptamer modulates a function of IL-23 or a variant thereof.

26) The aptamer of claim 25, wherein the aptamer inhibits a function of IL-23 or a variant thereof.

27) The aptamer of claim 26, wherein the aptamer inhibits a function of IL-23 or a variant thereof *in vivo*.

28) The aptamer of claim 26, wherein the aptamer prevents binding of IL-23 to the IL-23 receptor.

29) The aptamer of claim 1, wherein the aptamer has substantially the same ability to bind IL-23 as that of an aptamer comprising a nucleotide sequence selected from the group consisting of: SEQ ID NOs 13-66, SEQ ID NOs 71-88, SEQ ID NOs 91-96, SEQ ID NOs 103-118, SEQ ID NOs 124-134, SEQ ID NOs 135-159, SEQ ID NO 162, and SEQ ID NOs 164-172, SEQ ID NOs 176-178, SEQ ID NOs 181-196, and SEQ ID NOs 199-314.

30) The aptamer of claim 1, wherein the aptamer has substantially the same structure and substantially the same ability to bind IL-23 as that of an aptamer comprising a nucleotide sequence selected from the group consisting of: SEQ ID NOs 13-66, SEQ ID NOs 71-88, SEQ ID NOs 91-96, SEQ ID NOs 103-118, SEQ ID NOs 124-134, SEQ ID NOs 135-159, SEQ ID NO 162, and SEQ ID NOs 164-172, SEQ ID NOs 176-178, SEQ ID NOs 181-196, and SEQ ID NOs 199-314.

31) The aptamer of claim 1, wherein the aptamer comprises a nucleic acid sequence at least 80% identical to any one of the sequences selected from the group consisting of: SEQ ID NOs 13-66, SEQ ID NOs 71-88, SEQ ID NOs 91-96, SEQ ID NOs 103-118, SEQ ID NOs 124-134, SEQ ID NOs 135-159, SEQ ID NO 162, and SEQ ID NOs 164-172, SEQ ID NOs 176-178, SEQ ID NOs 181-196, and SEQ ID NOs 199-314.

32) The aptamer of claim 31, wherein the aptamer nucleic acid sequence is at least 90% identical to any one of the sequences selected from the group consisting of: SEQ ID NOs 13-66, SEQ ID NOs 71-88, SEQ ID NOs 91-96, SEQ ID NOs 103-118, SEQ ID NOs 124-134, SEQ ID NOs 135-159, SEQ ID NO 162, and SEQ ID NOs 164-172, SEQ ID NOs 176-178, SEQ ID NOs 181-196, and SEQ ID NOs 199-314.

33) The aptamer of claim 1, wherein the aptamer comprises 20 contiguous nucleotides that are identical to a sequence of 20 contiguous nucleotides in the unique sequence region of any one of the sequences selected from the group of: SEQ ID NOs 13-66, SEQ ID NOs 71-88, SEQ ID NOs 91-96, SEQ ID NOs 103-118, SEQ ID NOs 124-134, SEQ ID NOs 135-159, SEQ ID NO 162, and SEQ ID NOs 164-172, SEQ ID NOs 176-178, SEQ ID NOs 181-196, and SEQ ID NOs 199-314.

34) The aptamer of claim 33, wherein the aptamer comprises 8 contiguous nucleotides that are identical to a sequence of 8 contiguous nucleotides in the unique sequence region of any one of the sequences selected from the group of: SEQ ID NOs 13-66,

SEQ ID NOs 71-88, SEQ ID NOs 91-96, SEQ ID NOs 103-118, SEQ ID NOs 124-134, SEQ ID NOs 135-159, SEQ ID NO 162, and SEQ ID NOs 164-172, SEQ ID NOs 176-178, SEQ ID NOs 181-196, and SEQ ID NOs 199-314.

35) The aptamer of claim 34, wherein the aptamer comprises 4 contiguous nucleotides that are identical to a sequence of 4 contiguous nucleotides in the unique sequence region of any one of the sequences selected from the group of: SEQ ID NOs 13-66, SEQ ID NOs 71-88, SEQ ID NOs 91-96, SEQ ID NOs 103-118, SEQ ID NOs 124-134, SEQ ID NOs 135-159, SEQ ID NO 162, and SEQ ID NOs 164-172, SEQ ID NOs 176-178, SEQ ID NOs 181-196, and SEQ ID NOs 199-314.

36) An aptamer capable of binding IL-23 or a variant thereof comprising a nucleotide sequence selected from the group consisting of: SEQ ID NOs 13-66, SEQ ID NOs 71-88, SEQ ID NOs 91-96, SEQ ID NOs 103-118, SEQ ID NOs 124-134, SEQ ID NOs 135-159, SEQ ID NO 162, and SEQ ID NOs 164-172, SEQ ID NOs 176-178, SEQ ID NOs 181-196, and SEQ ID NOs 199-314.

37) The aptamer of claim 36, further comprising at least one chemical modification.

38) The aptamer of claim 37, wherein the modification is selected from the group consisting: of a chemical substitution at a sugar position; a chemical substitution at a phosphate position; and a chemical substitution at a base position, of the nucleic acid.

39) The aptamer of claim 37, wherein the modification is selected from the group consisting of: incorporation of a modified nucleotide; 3' capping; conjugation to a high molecular weight, non-immunogenic compound; conjugation to a lipophilic compound; and phosphate backbone modification.

40) The aptamer of claim 39, wherein the high molecular weight, non-immunogenic compound is polyalkylene glycol.

41) The aptamer of claim 40, wherein the polyalkylene glycol is polyethylene glycol.

42) The aptamer of claim 39, wherein the backbone modification comprises incorporation of one or more phosphorothioates into the phosphate backbone.

43) The aptamer of claim 42, wherein the aptamer comprises the incorporation of fewer than 10 phosphorothioates in the phosphate backbone.

146

44) The aptamer of claim 43, wherein the aptamer comprises the incorporation of fewer than 6 phosphorothioates in the phosphate backbone.

45) The aptamer of claim 44, wherein the aptamer comprises the incorporation of fewer than 3 phosphorothioates in the phosphate backbone.

46) The aptamer of claim 1, further capable of binding to IL-12.

47) The aptamer of claim 46, wherein IL-12 is a variant of IL-12 that performs a biological function that is essentially the same as a function of IL-12.

48) The aptamer of claim 47 wherein the variant of IL-12 has substantially the same structure and substantially the same ability to bind said aptamer as that of IL-12.

49) The aptamer of claim 48, wherein IL-12 or a variant thereof comprises an amino acid sequence that is at least 80% identical to a sequence comprising SEQ ID NOs 4 and 6.

50) The aptamer of claim 48, wherein IL-12 or a variant thereof comprises an amino acid sequence that is at least 90% identical to a sequence comprising SEQ ID NOs 4 and 6.

51) The aptamer of claim 48, wherein IL-12 or a variant thereof has an amino acid sequence comprising SEQ ID NOs 4 and 6.

52) The aptamer of claim 51, wherein the aptamer modulates a function of IL-12 or a variant thereof.

53) The aptamer of claim 52, wherein the aptamer inhibits a function of IL-12 or a variant thereof.

54) The aptamer of claim 53, wherein the aptamer inhibits a function of IL-12 or a variant thereof *in vivo*.

55) The aptamer of claim 53, wherein the aptamer prevents binding of IL-12 to the IL-12 receptor.

56) The aptamer of claim 4, wherein IL-23 or a variant thereof is mouse IL-23.

57) The aptamer of claim 56, wherein mouse IL-23 has an amino acid sequence comprising SEQ ID NOs 315 and 316.

58) A pharmaceutical composition comprising a therapeutically effective amount of an aptamer comprising a nucleic acid sequence selected from the group consisting of: SEQ ID NOs 13-66, SEQ ID NOs 71-88, SEQ ID NOs 91-96, SEQ ID NOs 103-118,

SEQ ID NOs 124-130, SEQ ID NOs 135-159, SEQ ID NO 162, and SEQ ID NOs 164-172, SEQ ID NOs 176-178, SEQ ID NOs 181-196, and SEQ ID NOs 203-314, or a salt thereof, and a pharmaceutically acceptable carrier or diluent.

59) A method of treating, preventing or ameliorating a disease mediated by IL-23, comprising administering the composition of claim 58 to a vertebrate.

60) The method of claim 59, wherein the vertebrate is a mammal.

61) The method of claim 60, wherein the mammal is a human.

62) The method of claim 59, wherein said disease is selected from the group consisting of: autoimmune disease, inflammatory disease, cancer, bone resorption in osteoporosis, and Type I Diabetes.

63) The method of claim 62, wherein the autoimmune disease is selected from the group consisting of: multiple sclerosis, rheumatoid arthritis, psoriasis, systemic lupus erythamatosus, and irritable bowel disease.

64) The method of claim 62, wherein the cancer is selected from the group consisting of: colon cancer, lung cancer, and lung metastases.

65) The method of claim 63, wherein the irritable disease is selected from the group consisting of Crohn's Disease and ulcerative colitis.

66) A pharmaceutical composition comprising a therapeutically effective amount of an aptamer comprising a nucleic acid sequence selected from the group consisting of: SEQ ID NO 14, SEQ ID NOs 17-19, SEQ ID NO 21, SEQ ID NOs 27-32, SEQ ID NOs 34-40, SEQ ID NO 42, SEQ ID NO 49, SEQ ID NOs 60-61, SEQ ID NOs 91-92, SEQ ID NO 94, and SEQ ID NOs 103-118, or a salt thereof, and a pharmaceutically acceptable carrier or diluent.

67) A method of treating, preventing or ameliorating a disease mediated by IL-12, comprising administering the composition of claim 66 to a human.

68) The method of claim 67, wherein said disease is selected from the group consisting of: autoimmune disease, inflammatory disease, cancer, bone resorption in osteoporosis, and Type I Diabetes.

69) The method of claim 68, wherein the autoimmune disease is selected from the group consisting of: multiple sclerosis, rheumatoid arthritis, psoriasis, systemic lupus erythamatosus, and irritable bowel disease.

70) The method of claim 68, wherein the cancer is selected from the group consisting of: colon cancer, lung cancer, and lung metastases.

71) The method of claim 69, wherein the irritable disease is selected from the group consisting of Crohn's Disease and ulcerative colitis.

72) A diagnostic method comprising contacting an aptamer of claim 36 with a composition suspected of comprising IL-23 or a variant thereof and detecting the presence or absence of IL-23 or a variant thereof.

73) An aptamer according to claim 36 for use as an *in vitro* diagnostic

74) An aptamer according to claim 36 for use as an *in vivo* diagnostic.

75) An aptamer according to claim 36 for use in the treatment, prevention or amelioration of disease *in vivo*.

199

Figure 1

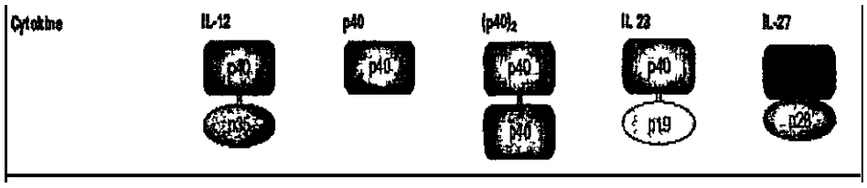
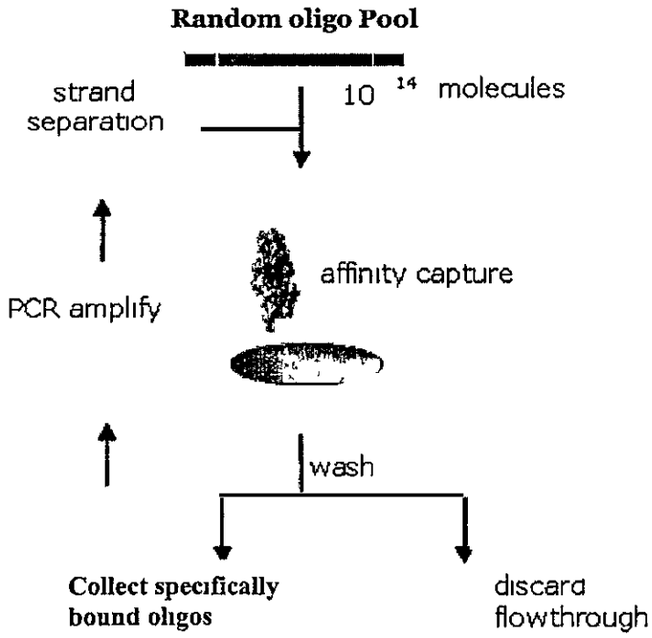
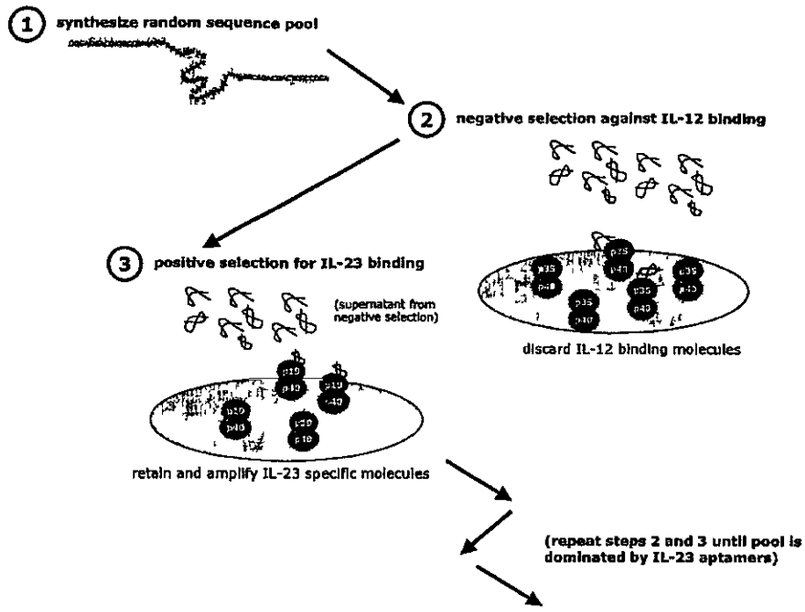


Figure 2



150

Figure 3


1 synthesize random sequence pool
2 negative selection against IL-12 binding
3 positive selection for IL-23 binding
(supernatant from negative selection)
discard IL-12 binding molecules
retain and amplify IL-23 specific molecules
(repeat steps 2 and 3 until pool is dominated by IL-23 aptamers)

151

Figure 4

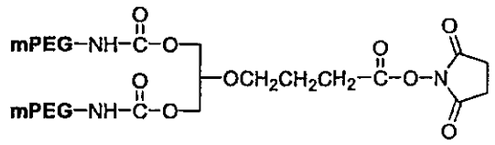
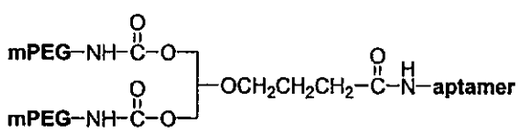
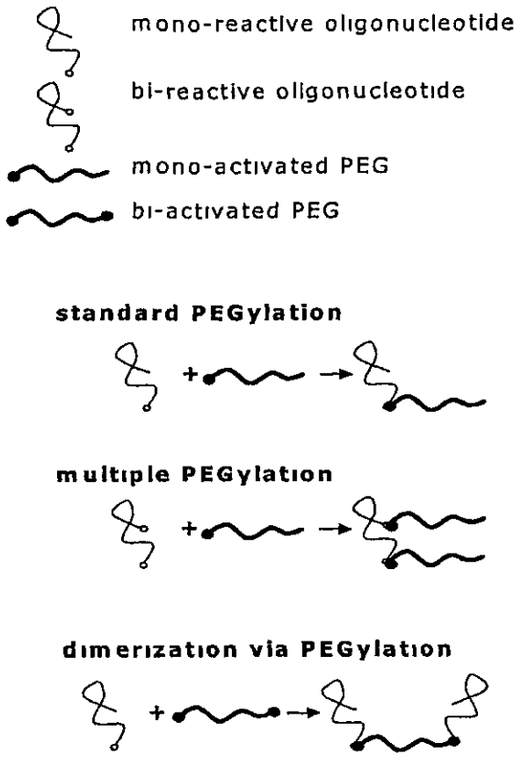


Figure 5



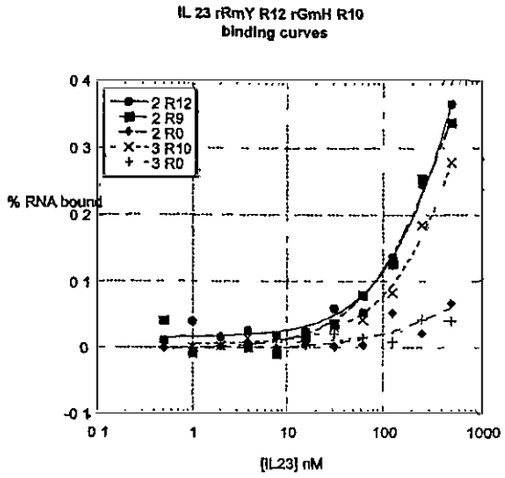
152

Figure 6


mono-reactive oligonucleotide
bi-reactive oligonucleotide
mono-activated PEG
bi-activated PEG
standard PEGylation
multiple PEGylation
dimerization via PEGylation

153

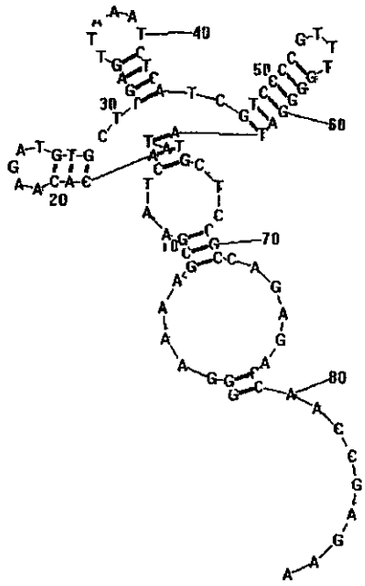
Figure 7


IL 23 rRmY R12 rGmH R10
binding curves
2 R12
2 R9
2 R0
3 R10
3 R0
% RNA bound
0 4
0 3
0 2
0 1
0
-0 1
0 1
1
10
100
1000
[IL23] nM

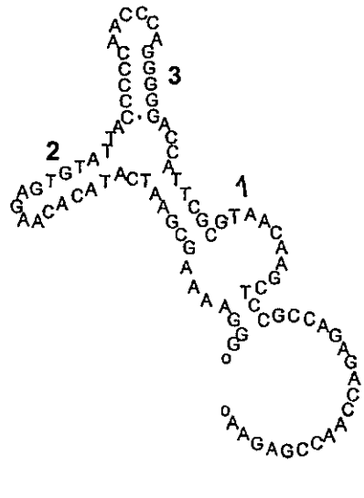
154

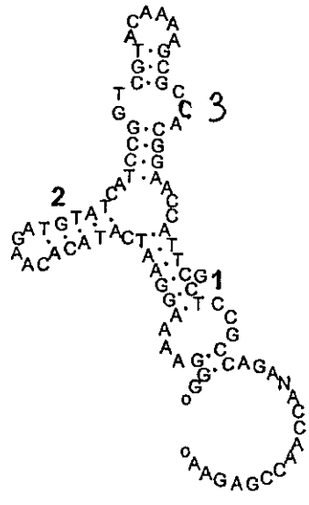
Figure 8

A)



B)



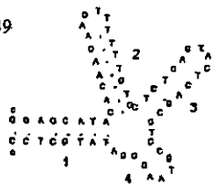


155

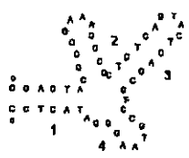
Figure 9

A)

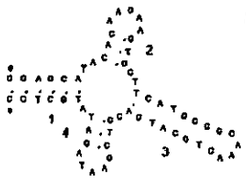
SEQ ID NO 139



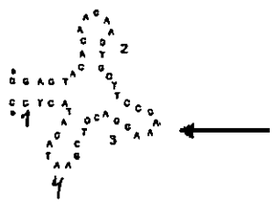
SEQ ID NO 140



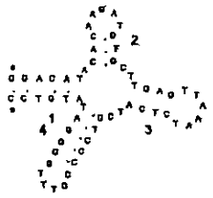
SEQ ID NO 144



SEQ ID NO 145

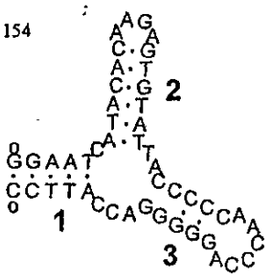


SEQ ID NO 147

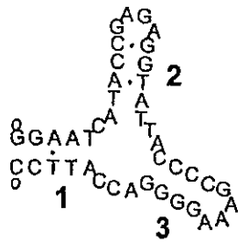


B)

SEQ ID NO 154

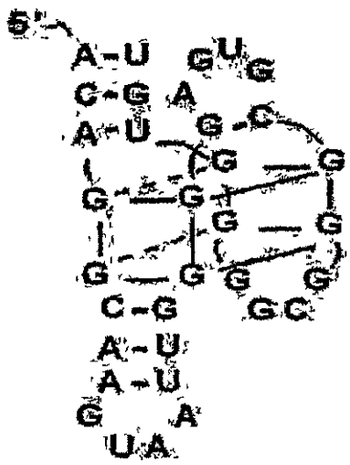


SEQ ID NO 153



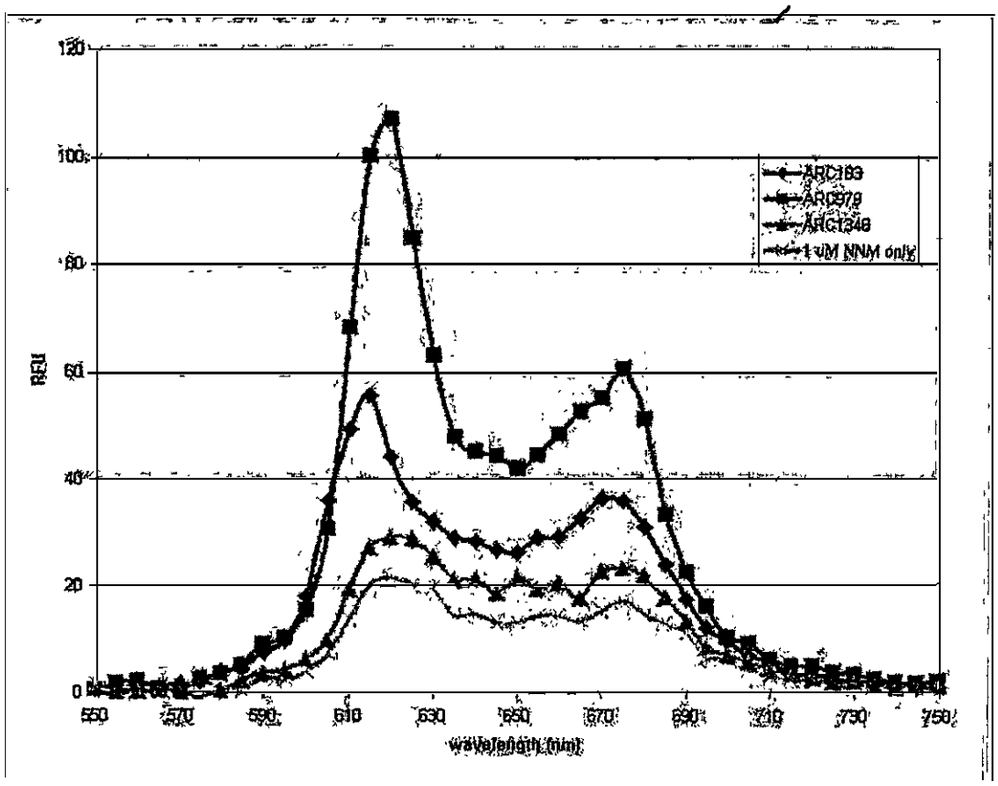
156

Figure 10



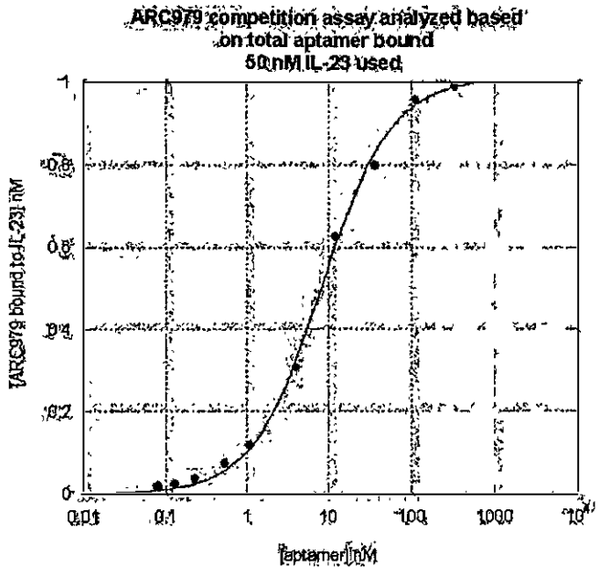
SEQ ID NO 177

Figure 11



158

Figure 12



159

Figure 13

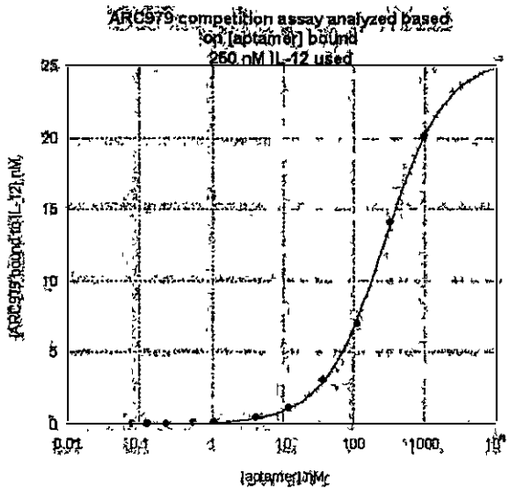
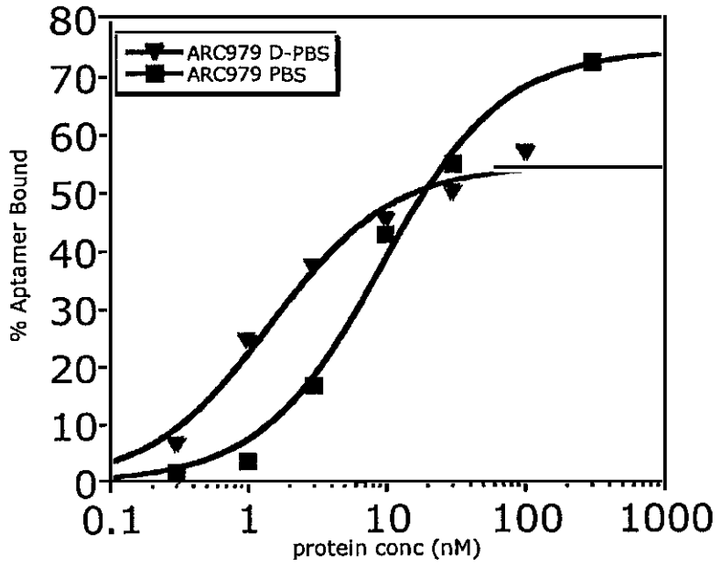


Figure 14


ARC979 D-PBS
ARC979 PBS
% Aptamer Bound
protein conc (nM)
0
10
20
30
40
50
60
70
80
0.1
1
10
100
1000

161

Figure 15

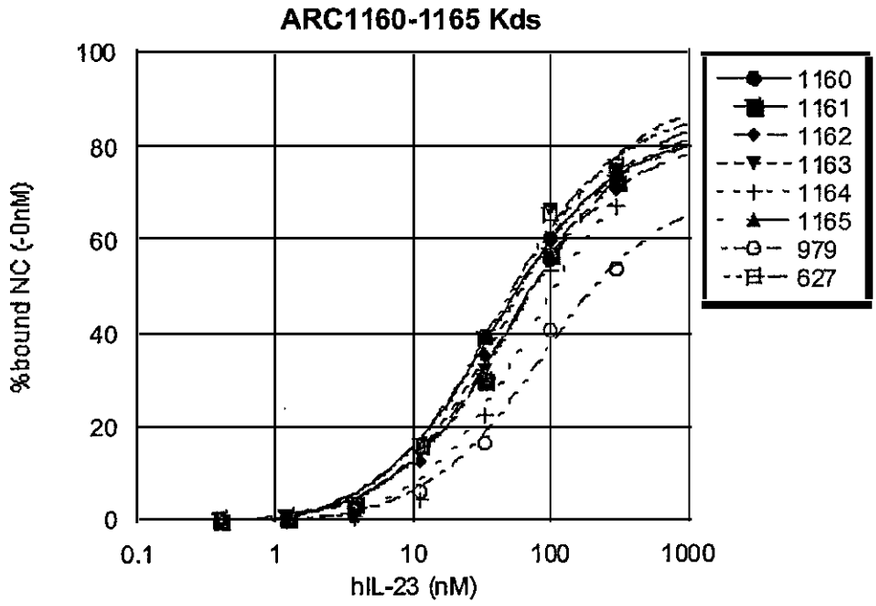


Figure 16

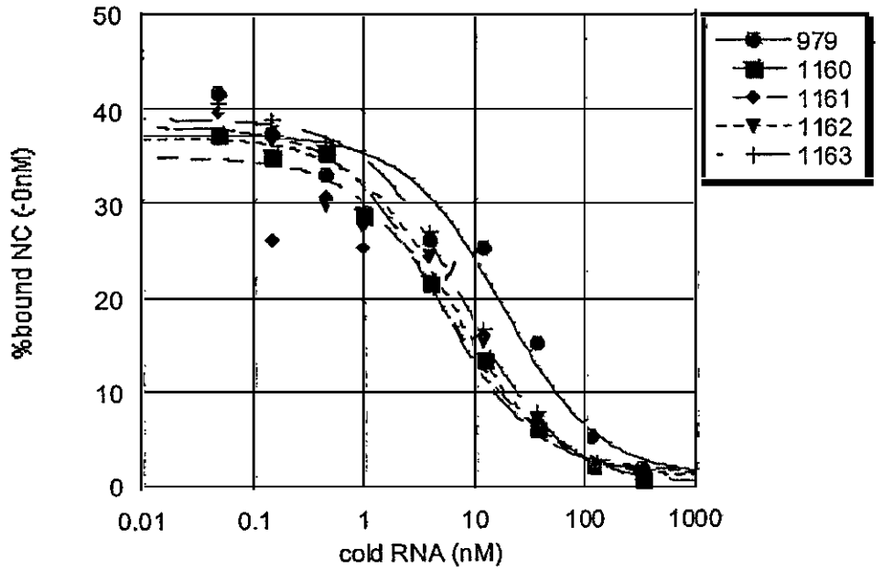
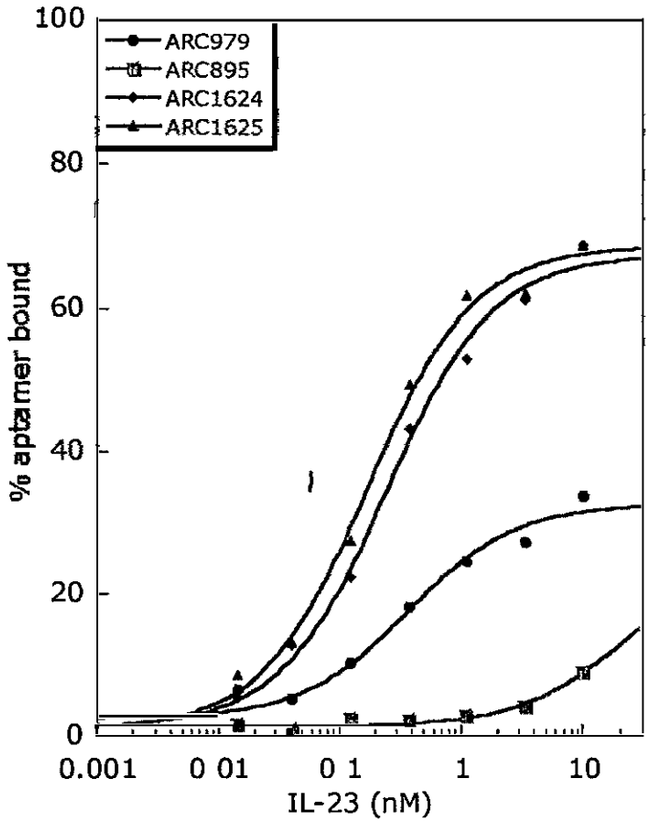

50
40
30
20
10
0
%bound NC (-0nM)
0.01
0.1
1
10
100
1000
cold RNA (nM)
979
1160
1161
1162
1163

Figure 17


ARC979
ARC895
ARC1624
ARC1625
% aptamer bound
100
80
60
40
20
0
0.001
0 01
0 1
1
10
IL-23 (nM)

164

Figure 18

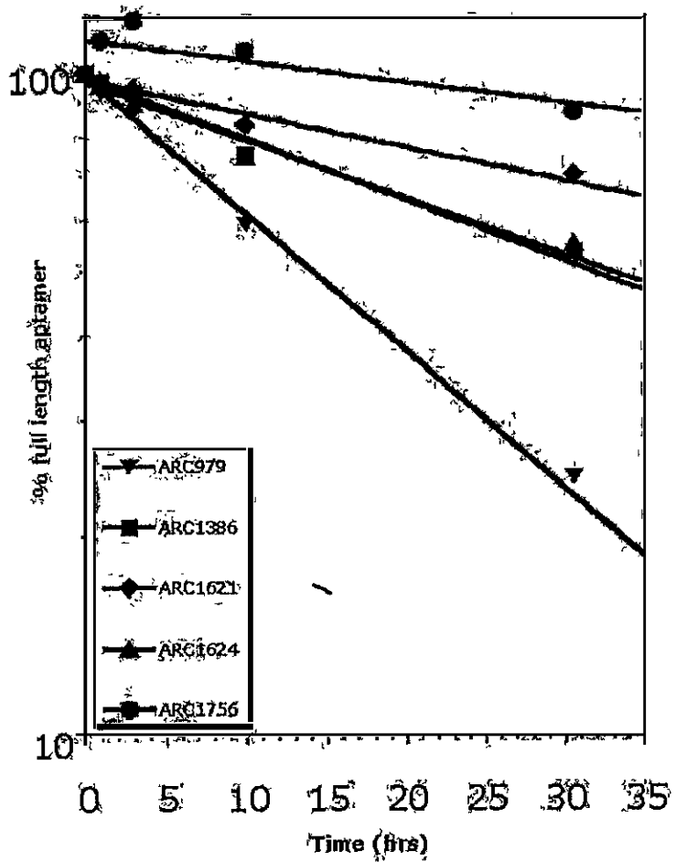


Figure 19

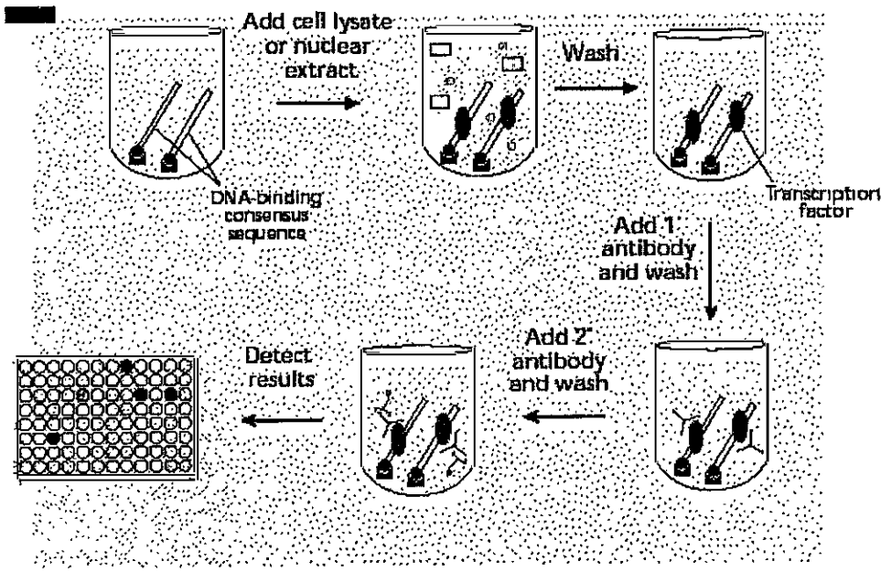

Add cell lysate or nuclear extract
Wash
DNA-binding consensus sequence
Transcription factor
Add 1° antibody and wash
Add 2° antibody and wash
Detect results

Figure 20

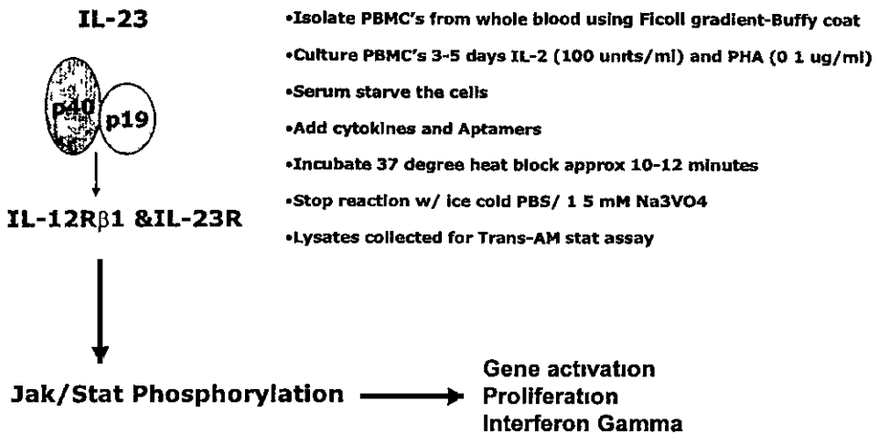
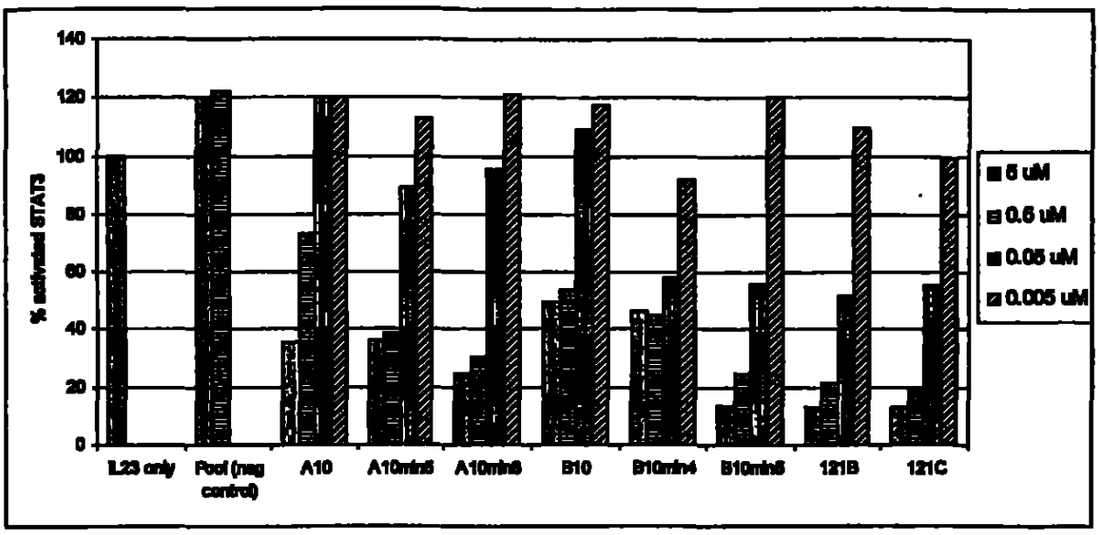
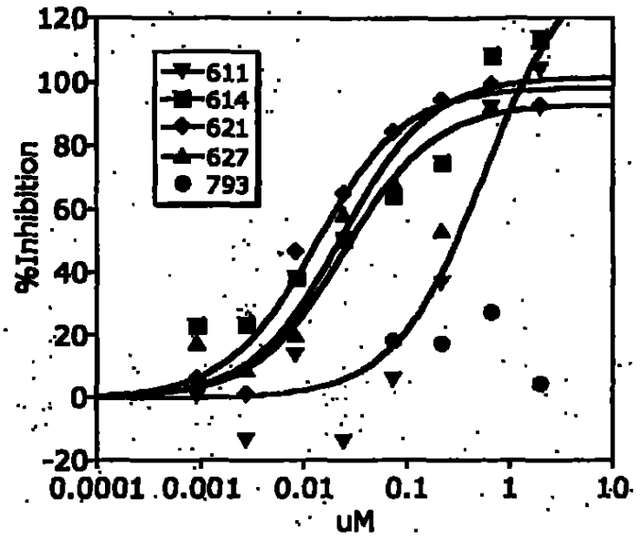

IL-23
p40
p19
IL-12Rβ1 &IL-23R
Jak/Stat Phosphorylation
•Isolate PBMC's from whole blood using Ficoll gradient-Buffy coat
•Culture PBMC's 3-5 days IL-2 (100 units/ml) and PHA (0 1 ug/ml)
•Serum starve the cells
•Add cytokines and Aptamers
•Incubate 37 degree heat block approx 10-12 minutes
•Stop reaction w/ ice cold PBS/ 1 5 mM Na3VO4
•Lysates collected for Trans-AM stat assay
Gene activation
Proliferation
Interferon Gamma

Figure 21


% activated STAT3
140
120
100
80
60
40
20
0
IL23 only
Pool (neg control)
A10
A10min5
A10min6
B10
B10min4
B10min5
121B
121C
5 uM
0.5 uM
0.05 uM
0.005 uM

168

Figure 22



169

Figure 23

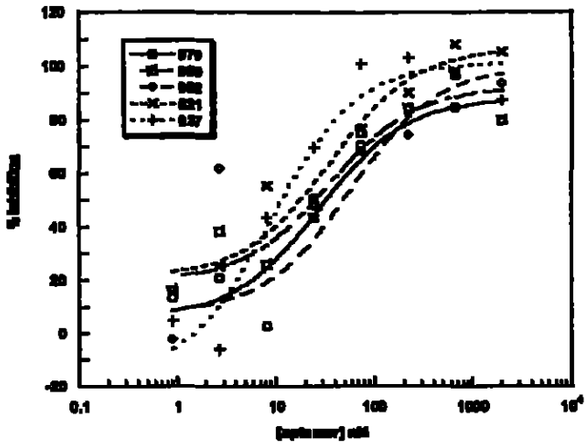


Figure 24

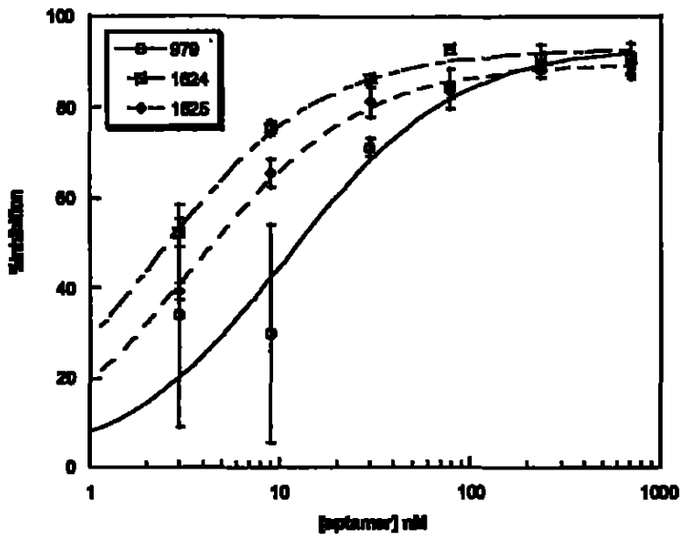
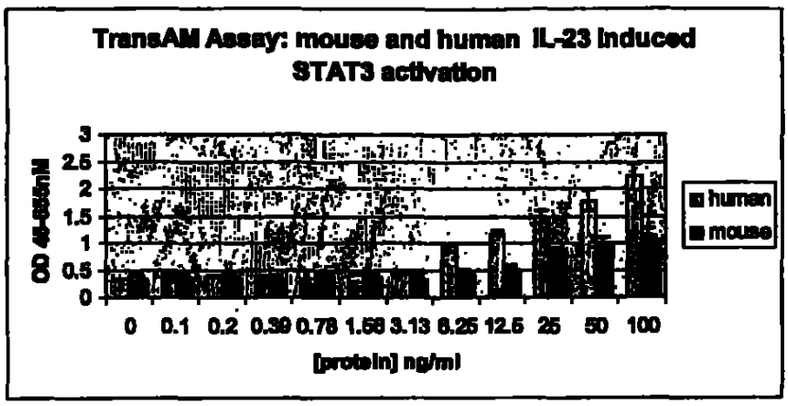


Figure 25


TransAM Assay: mouse and human IL-23 induced STAT3 activation
OD 450-655nM
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
0 0.1 0.2 0.39 0.78 1.56 3.13 6.25 12.5 25 50 100
[protein] ng/ml
human
mouse

SEQUENCE LISTING

<110> Archemix Corp., et al.

<120> Aptamers to the Human IL-12 Cytokine Family and Their Use as Autoimmune Disease Therapeutics

<130> 23239-578-061

<150> 60/550,962
<151> 2004-03-05

<150> 60/608,046
<151> 2004-09-07

<160> 317

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1
<211> 93
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic template

<220>
<221> misc_feature
<222> (25)..(54)
<223> n is a, t, c, or g

<400> 1
catcgatgct agtcgtaacg atccnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnncgagaa 60

cgttctctcc tctccctata gtgagtcgta tta 93

<210> 2
<211> 92
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic template

<220>
<221> misc_feature
<222> (24)..(53)
<223> n is a, t, c, or g

<400> 2
catgcatcgc gactgactag ccgnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnngtagaac 60

gttctctcct ctccctatag tgagtcgtat ta 92

<210> 3
<211> 92
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic template

<220>
<221> misc_feature
<222> (24)..(53)
<223> n is a, t, c, or g

<400> 3
catcgatcga tcgatcgaca gcgnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnngtagaac 60

gttctctcct ctcctatag tgagtcgtat ta 92

<210> 4
<211> 328
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 4

Met Cys His Gln Gln Leu Val Ile Ser Trp Phe Ser Leu Val Phe Leu
1 5 10 15

Ala Ser Pro Leu Val Ala Ile Trp Glu Leu Lys Lys Asp Val Tyr Val
20 25 30

Val Glu Leu Asp Trp Tyr Pro Asp Ala Pro Gly Glu Met Val Val Leu
35 40 45

Thr Cys Asp Thr Pro Glu Glu Asp Gly Ile Thr Trp Thr Leu Asp Gln
50 55 60

Ser Ser Glu Val Leu Gly Ser Gly Lys Thr Leu Thr Ile Gln Val Lys
65 70 75 80

Glu Phe Gly Asp Ala Gly Gln Tyr Thr Cys His Lys Gly Gly Glu Val
85 90 95

Leu Ser His Ser Leu Leu Leu Leu His Lys Lys Glu Asp Gly Ile Trp
100 105 110

Ser Thr Asp Ile Leu Lys Asp Gln Lys Glu Pro Lys Asn Lys Thr Phe
115 120 125

Leu Arg Cys Glu Ala Lys Asn Tyr Ser Gly Arg Phe Thr Cys Trp Trp
130 135 140

Leu Thr Thr Ile Ser Thr Asp Leu Thr Phe Ser Val Lys Ser Ser Arg
145 150 155 160

Gly Ser Ser Asp Pro Gln Gly Val Thr Cys Gly Ala Ala Thr Leu Ser
165 170 175

Ala Glu Arg Val Arg Gly Asp Asn Lys Glu Tyr Glu Tyr Ser Val Glu
180 185 190

Cys Gln Glu Asp Ser Ala Cys Pro Ala Ala Glu Glu Ser Leu Pro Ile
195 200 205

Glu Val Met Val Asp Ala Val His Lys Leu Lys Tyr Glu Asn Tyr Thr
210 215 220

Ser Ser Phe Phe Ile Arg Asp Ile Ile Lys Pro Asp Pro Pro Lys Asn
225 230 235 240

Leu Gln Leu Lys Pro Leu Lys Asn Ser Arg Gln Val Glu Val Ser Trp
245 250 255

Glu Tyr Pro Asp Thr Trp Ser Thr Pro His Ser Tyr Phe Ser Leu Thr
260 265 270

Phe Cys Val Gln Val Gln Gly Lys Ser Lys Arg Glu Lys Lys Asp Arg
275 280 285

Val Phe Thr Asp Lys Thr Ser Ala Thr Val Ile Cys Arg Lys Asn Ala
290 295 300

Ser Ile Ser Val Arg Ala Gln Asp Arg Tyr Tyr Ser Ser Ser Trp Ser
305 310 315 320

Glu Trp Ala Ser Val Pro Cys Ser
325

<210> 5

175

<211> 189
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 5

Met Leu Gly Ser Arg Ala Val Met Leu Leu Leu Leu Leu Pro Trp Thr
1 5 10 15

Ala Gln Gly Arg Ala Val Pro Gly Gly Ser Ser Pro Ala Trp Thr Gln
20 25 30

Cys Gln Gln Leu Ser Gln Lys Leu Cys Thr Leu Ala Trp Ser Ala His
35 40 45

Pro Leu Val Gly His Met Asp Leu Arg Glu Glu Gly Asp Glu Glu Thr
50 55 60

Thr Asn Asp Val Pro His Ile Gln Cys Gly Asp Gly Cys Asp Pro Gln
65 70 75 80

Gly Leu Arg Asp Asn Ser Gln Phe Cys Leu Gln Arg Ile His Gln Gly
85 90 95

Leu Ile Phe Tyr Glu Lys Leu Leu Gly Ser Asp Ile Phe Thr Gly Glu
100 105 110

Pro Ser Leu Leu Pro Asp Ser Pro Val Gly Gln Leu His Ala Ser Leu
115 120 125

Leu Gly Leu Ser Gln Leu Leu Gln Pro Glu Gly His His Trp Glu Thr
130 135 140

Gln Gln Ile Pro Ser Leu Ser Pro Ser Gln Pro Trp Gln Arg Leu Leu
145 150 155 160

Leu Arg Phe Lys Ile Leu Arg Ser Leu Gln Ala Phe Val Ala Val Ala
165 170 175

Ala Arg Val Phe Ala His Gly Ala Ala Thr Leu Ser Pro
180 185

<210> 6
<211> 253
<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 6

Met Trp Pro Pro Gly Ser Ala Ser Gln Pro Pro Pro Ser Pro Ala Ala
1 5 10 15

Ala Thr Gly Leu His Pro Ala Ala Arg Pro Val Ser Leu Gln Cys Arg
20 25 30

Leu Ser Met Cys Pro Ala Arg Ser Leu Leu Leu Val Ala Thr Leu Val
35 40 45

Leu Leu Asp His Leu Ser Leu Ala Arg Asn Leu Pro Val Ala Thr Pro
50 55 60

Asp Pro Gly Met Phe Pro Cys Leu His His Ser Gln Asn Leu Leu Arg
65 70 75 80

Ala Val Ser Asn Met Leu Gln Lys Ala Arg Gln Thr Leu Glu Phe Tyr
85 90 95

Pro Cys Thr Ser Glu Glu Ile Asp His Glu Asp Ile Thr Lys Asp Lys
100 105 110

Thr Ser Thr Val Glu Ala Cys Leu Pro Leu Glu Leu Thr Lys Asn Glu
115 120 125

Ser Cys Leu Asn Ser Arg Glu Thr Ser Phe Ile Thr Asn Gly Ser Cys
130 135 140

Leu Ala Ser Arg Lys Thr Ser Phe Met Met Ala Leu Cys Leu Ser Ser
145 150 155 160

Ile Tyr Glu Asp Leu Lys Met Tyr Gln Val Glu Phe Lys Thr Met Asn
165 170 175

Ala Lys Leu Leu Met Asp Pro Lys Arg Gln Ile Phe Leu Asp Gln Asn
180 185 190

Met Leu Ala Val Ile Asp Glu Leu Met Gln Ala Leu Asn Phe Asn Ser
195 200 205

Glu Thr Val Pro Gln Lys Ser Ser Leu Glu Glu Pro Asp Phe Tyr Lys

177

210 215 220

Thr Lys Ile Lys Leu Cys Ile Leu Leu His Ala Phe Arg Ile Arg Ala
225 230 235 240

Val Thr Ile Asp Arg Val Met Ser Tyr Leu Asn Ala Ser
245 250

<210> 7
<211> 10
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic CpG

<400> 7
aacgttcgag 10

<210> 8
<211> 88
<212> RNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic template

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(88)
<223> all purines (A and G) are 2'-OH, all pyrimidines (C and U) are 2'-fluoro

<220>
<221> misc_feature
<222> (25)..(64)
<223> n is a, u, c, or g

<400> 8
gggaaaagcg aaucauacac aagannnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 60

nnnngcuccg ccagagacca accgagaa 88

<210> 9
<211> 41
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic primer

178

<400> 9
taatacgact cactataggg aaaagcgaat catacacaag a 41

<210> 10
<211> 24
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic primer

<400> 10
ttctcggttg gtctctggcg gagc 24

<210> 11
<211> 24
<212> RNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic fixed region

<400> 11
gggaaaagcg aaucauacac aaga 24

<210> 12
<211> 24
<212> RNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic fixed region

<400> 12
gcuccgccag agaccaaccg agaa 24

<210> 13
<211> 88
<212> RNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(88)
<223> all purines (A and G) are 2'-OH, all pyrimidines (C and U) are 2'-fluoro

<400> 13
gggaaaagcg aaucauacac aagagaggua uguggguuug cggagcaacu cgugucagcg 60

gucagcuccg ccagagacca accgagaa 88

<210> 14
<211> 88
<212> RNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(88)
<223> all purines (A and G) are 2'-OH, all pyrimidines (C and U) are 2'-fluoro

<400> 14
gggaaaagcg aaucauacac aagaaugaau uccguccacg ggcgcccgau gaugucaguu 60

uucggcuccg ccagagacca accgagaa 88

<210> 15
<211> 88
<212> RNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(88)
<223> all purines (A and G) are 2'-OH, all pyrimidines (C and U) are 2'-fluoro

<400> 15
gggaaaagcg aaucauacac aagauuagug cguguguuga aagggcucau aaugucagua 60

ucgagcuccg ccagagacca accgagaa 88

<210> 16
<211> 88
<212> RNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base

180

<222> (1)..(88)
<223> all purines (A and G) are 2'-OH, all pyrimidines (C and U) are 2'-fluoro

<400> 16
gggaaaagcg aaucauacac aagauuaggc gucgugacaa uaacuggucc acgagcaugu 60

cagugcuccg ccagagacca accgagaa 88

<210> 17
<211> 88
<212> RNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(88)
<223> all purines (A and G) are 2'-OH, all pyrimidines (C and U) are 2'-fluoro

<400> 17
gggaaaagcg aaucauacac aagauggaag gcgaucguag caguaaccca augauuggga 60

ccuagcuccg ccagagacca accgagaa 88

<210> 18
<211> 88
<212> RNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(88)
<223> all purines (A and G) are 2'-OH, all pyrimidines (C and U) are 2'-fluoro

<400> 18
gggaaaagcg aaucauacac aagaucucuu uggccgacgc aacaaugcuc uuuuccgacc 60

uugcgcuccg ccagagacca accgagaa 88

<210> 19
<211> 89
<212> RNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(89)
<223> all purines (A and G) are 2'-OH, all pyrimidines (C and U) are 2'-fluoro

<220>
<221> misc_feature
<222> (50)..(50)
<223> n is a, u, c, or g

<220>
<221> misc_feature
<222> (57)..(57)
<223> n is a, u, c, or g

<220>
<221> misc_feature
<222> (63)..(63)
<223> n is a, u, c, or g

<400> 19
gggaaaagcg aauccuaccc aagauguugu uggcguugau cguaugaaun auggagngug 60

ucngugcucc gccagagacc aaccgagaa 89

<210> 20
<211> 88
<212> RNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(88)
<223> all purines (A and G) are 2'-OH, all pyrimidines (C and U) are 2'-fluoro

<400> 20
gggaaaagcg aaucauacac aagaugcgcu auguuuggcu gggaauugua gcauugcuca 60

aguggcuccg ccagagacca accgagaa 88

<210> 21
<211> 88
<212> RNA
<213> artificial

182

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(88)
<223> all purines (A and G) are 2'-OH, all pyrimidines (C and U) are 2'-fluoro

<220>
<221> misc_feature
<222> (54)..(54)
<223> n is a, u, c, or g

<400> 21
gggaaaagcg aaucauacac aagauguuga accucuugug cgucccgaug uuungcaaug 60

uggagcuccg ccagagacca accgagaa 88

<210> 22
<211> 88
<212> RNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(88)
<223> all purines (A and G) are 2'-OH, all pyrimidines (C and U) are 2'-fluoro

<400> 22
gggaaaagcg aaucauacac aagaauguau acaaugcccu aucgucaguu aggcaugugu 60

ggaugcuccg ccagagacca accgagaa 88

<210> 23
<211> 89
<212> RNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(89)
<223> all purines (A and G) are 2'-OH, all pyrimidines (C and U) are 2'-fluoro

183

<400> 23
gggaaaagcg aaucauacac aagacagagg caaugagagc cuggcgaugu cagucgcauc 60

uugcugcucc gccagagacc aaccgagaa 89

<210> 24
<211> 88
<212> RNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(88)
<223> all purines (A and G) are 2'-OH, all pyrimidines (C and U) are 2'-fluoro

<400> 24
gggaaaagcg aaucauacac aagaucgcaa aaggaguuug ucucugcucu cggagugugu 60

cagugcuccg ccagagacca accgagaa 88

<210> 25
<211> 88
<212> RNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(88)
<223> all purines (A and G) are 2'-OH, all pyrimidines (C and U) are 2'-fluoro

<400> 25
gggaaaagcg aaucauacac aagagaugac uacacgccag ugugcgcuuu uugcggaguu 60

agcggcuccg ccagagacca accgagaa 88

<210> 26
<211> 89
<212> RNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

784

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(89)
<223> all purines (A and G) are 2'-OH, all pyrimidines (C and U) are 2'-fluoro

<400> 26
gggaaaagcg aaucauacac aagagucgug augauuuggg uuaugucagu ucccuguaug 60

guuucgcucc gccagagacc aaccgagaa 89

<210> 27
<211> 88
<212> RNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(88)
<223> all purines (A and G) are 2'-OH, all pyrimidines (C and U) are 2'-fluoro

<400> 27
gggaaaagcg aaucauacac aagaguuuua uguggguccc gaugauuaac uuuauuggcg 60

cauugcuccg ccagagacca accgagaa 88

<210> 28
<211> 90
<212> RNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(90)
<223> all purines (A and G) are 2'-OH, all pyrimidines (C and U) are 2'-fluoro

<400> 28
gggaaaagcg aaucauacac aagagaacga guauauuugc gcuggcggag aagucucucg 60

aagggagcuc cgccagagac caaccgagaa 90

<210> 29
<211> 88
<212> RNA

185

<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(88)
<223> all purines (A and G) are 2'-OH, all pyrimidines (C and U) are 2'-fluoro

<400> 29
gggaaaagcg aaucauacac aagaguauca uucggcuggu gggagaaauc ucuguagaua 60

uagagcuccg ccagagacca accgagaa 88

<210> 30
<211> 88
<212> RNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(88)
<223> all purines (A and G) are 2'-OH, all pyrimidines (C and U) are 2'-fluoro

<400> 30
gggaaaagcg aaucauacac aagauagcgu cuaugauggc ggagaagcaa guguagcaua 60

acaggcuccg ccagagacca accgagaa 88

<210> 31
<211> 88
<212> RNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(88)
<223> all purines (A and G) are 2'-OH, all pyrimidines (C and U) are 2'-fluoro

<400> 31
gggaaaagcg aaucauacac aagaguguug aaugagcgcu gguggacaga ucuuugguua 60

cagagcuccg ccagagacca accgagaa 88

<210> 32
<211> 88
<212> RNA
<213> artificial.

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(88)
<223> all purines (A and G) are 2'-OH, all pyrimidines (C and U) are 2'-fluoro

<400> 32
gggaaaagcg aaucauacac aagacucaug gauauggccu agcagccgug gaagcgguca 60

uucugcuccg ccagagacca accgagaa 88

<210> 33
<211> 88
<212> RNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(88)
<223> all purines (A and G) are 2'-OH, all pyrimidines (C and U) are 2'-fluoro

<400> 33
gggaaaagcg aaucauacac aagaucccag cgguacguga gucuguuaaa ggccaccuaa 60

ugucgcuccg ccagagacca accgagaa 88

<210> 34
<211> 87
<212> RNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(87)

987

<223> all purines (A and G) are 2'-OH, all pyrimidines (C and U) are 2'-fluoro

<400> 34
gggaaaagcg aaucauacac aagaguaaug uggguccega ugauucgcug ugcggcgunu 60

guagcuccgc cagagaccaa ccgagaa 87

<210> 35
<211> 88
<212> RNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(88)
<223> all purines (A and G) are 2'-OH, all pyrimidines (C and U) are 2'-fluoro

<220>
<221> misc_feature
<222> (44)..(44)
<223> n at position 44 is a, u, c, or g

<400> 35
gggaaaagcg aaucauacac aagagguuga guacgacgga gucnuggcua acacggaaac 60

uagagcuccg ccagagacca accgagaa 88

<210> 36
<211> 88
<212> RNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(88)
<223> all purines (A and G) are 2'-OH, all pyrimidines (C and U) are 2'-fluoro

<400> 36
gggaaaagcg aaucauacac aagagucaug gcuuacaauu gaaacaagag cucgcgugac 60

acaugcuccg ccagagacca accgagaa 88

<210> 37

498

<211> 88
<212> RNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(88)
<223> all purines (A and G) are 2'-OH, all pyrimidines (C and U) are 2'-fluoro

<400> 37
gggaaaagcg aaucauacac aagaacggcu aggcaucaau ggccagcaaa aauagucgug 60

uaaugcuccg ccagagacca accgagaa 88

<210> 38
<211> 88
<212> RNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(88)
<223> all purines (A and G) are 2'-OH, all pyrimidines (C and U) are 2'-fluoro

<400> 38
gggaaaagcg aaucauacac aagaccaucg gacgaggcgg gucaccuuuu acgcuuucga 60

gcuggcuccg ccagagacca accgagaa 88

<210> 39
<211> 88
<212> RNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(88)
<223> all purines (A and G) are 2'-OH, all pyrimidines (C and U) are 2'-fluoro

<400> 39

gggaaaagcg aaucauacac aagaugguuc ccacgugaaa guggcuagcg aguaccccac 60

uuaugcuccg ccagagacca accaaggg 88

<210> 40
<211> 90
<212> RNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(90)
<223> all purines (A and G) are 2'-OH, all pyrimidines (C and U) are 2'-fluoro

<220>
<221> misc_feature
<222> (61)..(61)
<223> n at position 61 is a, u, c, or g

<400> 40
gggaaaagcg aaucauacac aagagcgcuu uagcggguau agcacuuuuc aucuaaugaa 60

nccguagcuc cgccagagac caaccgagaa 90

<210> 41
<211> 88
<212> RNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(88)
<223> all purines (A and G) are 2'-OH, all pyrimidines (C and U) are 2'-fluoro

<400> 41
gggaaaagcg aaucauacac aagaucuacg auuguucagg uuuuuuguac ucaacuaaag 60

gcgagcuccg ccagagacca accgagaa 88

<210> 42
<211> 88
<212> RNA
<213> artificial

190

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(88)
<223> all purines (A and G) are 2'-OH, all pyrimidines (C and U) are 2'-fluoro

<400> 42
gggaaaagcg aaucauacac aagauugucu cggauugguc acucccauuu uuguucgcuu 60

aacggcuccg ccagagacca accgagaa 88

<210> 43
<211> 89
<212> RNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(89)
<223> all purines (A and G) are 2'-OH, all pyrimidines (C and U) are 2'-fluoro

<400> 43
gggaaaagcg aaucauacac aagaaguuuu uugugcucug aguacucagc gucoguaagg 60

gauaugcucc gccagagacc aaccgagaa 89

<210> 44
<211> 88
<212> RNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(88)
<223> all purines (A and G) are 2'-OH, all pyrimidines (C and U) are 2'-fluoro

<400> 44
gggaaaagcg aaucauacac aagaagugcu ucaugcggca aacugcauga cgucgaauag 60

auaugcuccg ccagagacca accgagaa 88

<210> 45
<211> 88
<212> RNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(88)
<223> all purines (A and G) are 2'-OH, all pyrimidines (C and U) are 2'-fluoro

<400> 45
gggaaaagcg aaucauacac aagagaggua ugugguuuug cggagcaacu cgugucagcg 60

gucagcucog ccagagacca accgagaa 88

<210> 46
<211> 88
<212> RNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(88)
<223> all purines (A and G) are 2'-OH, all pyrimidines (C and U) are 2'-fluoro

<400> 46
gggaaaagcg aaucauacac aagaugugcu ugaguuaaau cucaucgucc ccguuugggg 60

auaugcucog ccagagacca accgagaa 88

<210> 47
<211> 88
<212> RNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(88)
<223> all purines (A and G) are 2'-OH, all pyrimidines (C and U) are 2'-fluoro

192

<400> 47
gggaaaagcg aaucauacac aagaaguuuu ugugcucuga guacucagcg uccguaaggg 60

auaugcuccg ccagagacca accgagaa 88

<210> 48
<211> 88
<212> RNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(88)
<223> all purines (A and G) are 2'-OH, all pyrimidines (C and U) are 2'-fluoro

<400> 48
gggaaaagcg aaucauacac aagagaugua uucaggcggu ccgcauugau gucaguuaug 60

cguagcuccg ccagagacca accgagaa 88

<210> 49
<211> 88
<212> RNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(88)
<223> all purines (A and G) are 2'-OH, all pyrimidines (C and U) are 2'-fluoro

<400> 49
gggaaaagcg aaucauacac aagaaugguc ggaaucucug gcgccacgcu gaguauagac 60

ggaagcuccg ccagagacca accgagaa 88

<210> 50
<211> 88
<212> RNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

193

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(88)
<223> all purines (A and G) are 2'-OH, all pyrimidines (C and U) are 2'-fluoro

<400> 50
gggaaaagcg aaucauacac aagagugcuu cguauguuga auacgacguu cgcaggacga 60

auaugcuccg ccagagacca accgagaa 88

<210> 51
<211> 87
<212> RNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(87)
<223> all purines (A and G) are 2'-OH, all pyrimidines (C and U) are 2'-fluoro

<220>
<221> misc_feature
<222> (75)..(75)
<223> n at position 75 is a, u, c, or g

<400> 51
agggaaaagg aaucauacac aagauguauc auccggucgu acaaaagcgc cacggaacca 60

uucgcuccgc cagaaaccaa ccgagaa 87

<210> 52
<211> 88
<212> RNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(88)
<223> all purines (A and G) are 2'-OH, all pyrimidines (C and U) are 2'-fluoro

<400> 52
gggaaaagcg aaucauacac aagacgcguc agguccacgc ugaaauuuau uuucggcagu 60

guaagcuccg ccagagacca accgagaa 88

<210> 53
<211> 88
<212> RNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(88)
<223> all purines (A and G) are 2'-OH, all pyrimidines (C and U) are 2'-fluoro

<400> 53
gggaaaagcg aaucauacac aagauaugug ccugggaugg acgacauccc cugucuaagg 60

auaugcuccg ccagagacca accgagaa 88

<210> 54
<211> 88
<212> RNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(88)
<223> all purines (A and G) are 2'-OH, all pyrimidines (C and U) are 2'-fluoro

<400> 54
gggaaaagcg aaucauacac aagauuacuc cguuaguguc aguugacgga gggagcguac 60

uauugcuccg ccagagacca accgagaa 88

<210> 55
<211> 88
<212> RNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(88)

795

<223> all purines (A and G) are 2'-OH, all pyrimidines (C and U) are 2'-fluoro

<400> 55
gggaaaagcg aaucauacac aagacauugu gcuuuaucac gugggugaua acgacgaaag 60

uuaugcuccg ccagagacca accgagaa 88

<210> 56
<211> 89
<212> RNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(89)
<223> all purines (A and G) are 2'-OH, all pyrimidines (C and U) are 2'-fluoro

<400> 56
gggaaaagcg aaucauacac aagacagugu augaggaaga uuacuuccau uccugagcgg 60

uuuucgcucc gccagagacc aaccgagaa 89

<210> 57
<211> 88
<212> RNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(88)
<223> all purines (A and G) are 2'-OH, all pyrimidines (C and U) are 2'-fluoro

<400> 57
gggaaaagcg aaucauacac aagauuggca augugaccuu caacccuuuu ccccaugaac 60

aguggcuccg ccagagacca accgagaa 88

<210> 58
<211> 88
<212> RNA
<213> artificial

<220>

<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(88)
<223> all purines (A and G) are 2'-OH, all pyrimidines (C and U) are 2'-fluoro

<400> 58
gggaaaagcg aaucauacac aagacaugac ugcaugcuuc gggaguaucu cgguccogac 60

guucgcuccg ccagagacca accgagaa 88

<210> 59
<211> 88
<212> RNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(88)
<223> all purines (A and G) are 2'-OH, all pyrimidines (C and U) are 2'-fluoro

<400> 59
gggaaaagcg aaucauacac aagacuuauc gccucaaggg ggguaauaaa cccagcgugu 60

gcaugcuccg ccagagacca accgagaa 88

<210> 60
<211> 89
<212> RNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(89)
<223> all purines (A and G) are 2'-OH, all pyrimidines (C and U) are 2'-fluoro

<400> 60
gggaaaagcg aaucauacac aagaauccug gcuucgcaua guguaugggu aguacgacag 60

cgcgugcucc gccagagacc aaccgagaa 89

197

<210> 61
<211> 89
<212> RNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(89)
<223> all purines (A and G) are 2'-OH, all pyrimidines (C and U) are 2'-fluoro

<400> 61
gggaaaagcg aaucauacac aagaacgcau agucggauuu accgaucauu cugugccuuc 60

gugacgcucc gccagagacc aaccgagaa 89

<210> 62
<211> 88
<212> RNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(88)
<223> all purines (A and G) are 2'-OH, all pyrimidines (C and U) are 2'-fluoro

<400> 62
gggaaaagcg aaucauacac aagaauuugug cuuacaacuu ucguuguacc gacgugucag 60

uuaugcuccg ccagagacca accgagaa 88

<210> 63
<211> 88
<212> RNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(88)
<223> all purines (A and G) are 2'-OH, all pyrimidines (C and U) are 2'-fluoro

<400> 63
gggaaaagcg aaucauacac aagaguguau uacccccaac ccaggggac cauucgcgua 60

acaagcuccg ccagagacca accgagaa 88

<210> 64
<211> 88
<212> RNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(88)
<223> all purines (A and G) are 2'-OH, all pyrimidines (C and U) are 2'-fluoro

<400> 64
gggaaaagcg aaucauacac aagacuuaac agugcggggc gcaguguaua gauccgcaau 60

gugugcuccg ccagagacca accgagaa 88

<210> 65
<211> 88
<212> RNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(88)
<223> all purines (A and G) are 2'-OH, all pyrimidines (C and U) are 2'-fluoro

<400> 65
gggaaaagcg aaucauacac aagacgauag uaugaccuuu ugaaaggcuu cccgagcggu 60

guucgcuccg ccagagacca accgagaa 88

<210> 66
<211> 88
<212> RNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

199

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(88)
<223> all purines (A and G) are 2'-OH, all pyrimidines (C and U) are 2'-fluoro

<400> 66
gggaaaagcg aaucauacac aagacgugug cuuuauguaa accauaacgu uccauaagga 60

auaugcuccg ccagagacca acegagaa 88

<210> 67
<211> 39
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic primer

<400> 67
taatacgact cactataggg agaggagaga acgttctac 39

<210> 68
<211> 22
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic primer

<400> 68
catcgatcga tcgatcgaca gc 22

<210> 69
<211> 22
<212> RNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic fixed region

<400> 69
gggagaggag agaacguucu ac 22

<210> 70
<211> 22
<212> RNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic fixed region

<400> 70

gcugucgauc gaucgaucga ug 22

<210> 71
<211> 74
<212> RNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(74)
<223> all purines (A and G) are 2'-OH, all pyrimidines (C and U) are 2'-O-methyl

<400> 71
gggagaggag agaacguucu acaaaugaga gcaggccgaa gaggagucgc ucgcugucga 60

ucgaucgauc gaug 74

<210> 72
<211> 74
<212> RNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(74)
<223> all purines (A and G) are 2'-OH, all pyrimidines (C and U) are 2'-O-methyl

<400> 72
gggagaggag agaacguucu acaaaugaga gcaggccgaa aaggagucgc ucgcugucga 60

ucgaucgauc gaug 74

<210> 73
<211> 74
<212> RNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(74)

<223> all purines (A and G) are 2'-OH, all pyrimidines (C and U) are 2'-O-methyl

<400> 73
gggagaggag agaacguucu acaaaugaga gcaggccgaa aaggagucgc ucgcugucga 60

ucgaucgauc gaug 74

<210> 74
<211> 75
<212> RNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(75)
<223> all purines (A and G) are 2'-OH, all pyrimidines (C and U) are 2'-O-methyl

<400> 74
gggagaggag agaacguucu acgguaaagc aggcugacug aaagguugaa gucgcugucg 60

aucgaucgau cgaug 75

<210> 75
<211> 74
<212> RNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(74)
<223> all purines (A and G) are 2'-OH, all pyrimidines (C and U) are 2'-O-methyl

<400> 75
gggagaggag agaacguucu acagguuaag agcaggcuca ggaauggaag ucgcugucga 60

ucgaucgauc gaug 74

<210> 76
<211> 75
<212> RNA
<213> artificial

<220>

<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(75)
<223> all purines (A and G) are 2'-OH, all pyrimidines (C and U) are 2'-O-methyl

<400> 76
gggagaggag agaacguucu acaacaaagc aggcucauag uaauauggaa gucgcugucg 60

aucgaucgau cgaug 75

<210> 77
<211> 75
<212> RNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(75)
<223> all purines (A and G) are 2'-OH, all pyrimidines (C and U) are 2'-O-methyl

<400> 77
gggagaggag agaacguucu acaacaaagc aggcucauag uaauauggaa gucgcugucg 60

aucgaucgau cgaug 75

<210> 78
<211> 74
<212> RNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(74)
<223> all purines (A and G) are 2'-OH, all pyrimidines (C and U) are 2'-O-methyl

<400> 78
gggagaggag agaacguucu acaaaagaga gcaggccgaa aaggagucgc ucgcugucga 60

ucgaucgauc gaug 74

<210> 79
<211> 75
<212> RNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(75)
<223> all purines (A and G) are 2'-OH, all pyrimidines (C and U) are 2'-O-methyl

<400> 79
gggagaggag agaacguucu acaaaaggca ggcucagggg aucacuggaa gucgcugucg 60

aucgaucgau cgaug 75

<210> 80
<211> 76
<212> RNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(76)
<223> all purines (A and G) are 2'-OH, all pyrimidines (C and U) are 2'-O-methyl

<400> 80
gggagaggag agaacguucu acaagauaua auuaaggaua agugcaaagg agacgcuguc 60

gaucgaucga ucgaug 76

<210> 81
<211> 74
<212> RNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(74)
<223> all purines (A and G) are 2'-OH, all pyrimidines (C and U) are 2'-O-methyl

<400> 81
gggagaggag agaacguucu acgaaugaga gcaggccgaa aaggagucgc ucgcugucga 60

ucgaucgauc gaug 74

<210> 82
<211> 75
<212> RNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(75)
<223> all purines (A and G) are 2'-OH, all pyrimidines (C and U) are 2'-O-methyl

<400> 82
gggagaggag agaacguucu acgagaggca agagagaguc gcauaaaaaa gacgcugucg 60

aucgaucgau cgaug 75

<210> 83
<211> 75
<212> RNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(75)
<223> all purines (A and G) are 2'-OH, all pyrimidines (C and U) are 2'-O-methyl

<400> 83
gggagaggag agaacguucu acgcaggcug ucguagacaa acgaugaagu cgcgcugucg 60

aucgaucgau cgaug 75

<210> 84
<211> 76
<212> RNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(76)
<223> all purines (A and G) are 2'-OH, all pyrimidines (C and U) are 2'-O-methyl

<400> 84
gggagaggag agaacguucu acggaaaaag auaugaaaga aaggauuaag agacgcuguc 60

gaucgaucga ucgaug 76

<210> 85
<211> 75
<212> RNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(75)
<223> all purines (A and G) are 2'-OH, all pyrimidines (C and U) are 2'-O-methyl

<220>
<221> misc_feature
<222> (29)..(29)
<223> n is a, u, c, or g

<220>
<221> misc_feature
<222> (35)..(35)
<223> n is a, u, c, or g

<220>
<221> misc_feature
<222> (64)..(64)
<223> n is a, u, c, or g

<220>
<221> misc_feature
<222> (68)..(68)
<223> n is a, u, c, or g

<220>
<221> misc_feature
<222> (72)..(72)
<223> n is a, u, c, or g

<400> 85
gggagaggag agaacguucu acggaaggna acaanagcac uguuugugca ggcgcugucg 60

aucnaucnau cnaug 75

<210> 86
<211> 73
<212> RNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(73)
<223> all purines (A and G) are 2'-OH, all pyrimidines (C and U) are 2'-O-methyl

<400> 86
gggagaggag agaacguucu acuaaugcag gcucaguuac uacuggaagu cgcugucgau 60

cgaucgaucg aug 73

<210> 87
<211> 75
<212> RNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(75)
<223> all purines (A and G) are 2'-OH, all pyrimidines (C and U) are 2'-O-methyl

<400> 87
aggagaggag agaacguucu acuagaagca ggcucgaaua caauucggaa gucgcugucg 60

aucgaucgau cgaug 75

<210> 88
<211> 75
<212> RNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(75)
<223> all purines (A and G) are 2'-OH, all pyrimidines (C and U) are 2'-O-methyl

<400> 88
gggagaggag agaacguucu acauaagcag gcuccgauag uauucgggaa gucgcugucg 60

aucgaucgau cgaug 75

<210> 89
<211> 22
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic primer

<400> 89
catcgatcga tcgatcgaca gc 22

<210> 90
<211> 22
<212> RNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic fixed region

<400> 90
gcugucgauc gaucgaucga ug 22

<210> 91
<211> 74
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(74)
<223> all purines (A and G) are deoxy, all pyrimidines (C and U) are 2'-O-methyl

<400> 91
gggagaggag agaacguucu acagcgccgg ugggcgggca uugggguggau gcgcugucga 60

ucgaucgauc gaug 74

<210> 92
<211> 75
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(75)
<223> all purines (A and G) are deoxy, all pyrimidines (C and U) are 2'-O-methyl

<400> 92
gggagaggag agaacguucu acagccuuuu ggguaagggg aggggugccg gucgcugucg 60

aucgaucgau cgaug 75

<210> 93
<211> 75
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(75)
<223> all purines (A and G) are deoxy, all pyrimidines (C and U) are 2'-O-methyl

<400> 93
gggagaggag agaacguucu acguaacggg gugggagggg cgaacaacuu gacgcugucg 60

aucgaucgau cgaug 75

<210> 94
<211> 74
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(74)
<223> all purines (A and G) are deoxy, all pyrimidines (C and U) are 2'-O-methyl

<400> 94
gggagaggag agaacguucu acagcgccgg ugggugggca uaggguggau gcgcugucga 60

ucgaucgauc gaug 74

<210> 95
<211> 75
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(75)
<223> all purines (A and G) are deoxy, all pyrimidines (C and U) are 2'-O-methyl

<400> 95
gggagaggag agaacguucu acgggcuacg gggauggagg gugggucccc gacgcugucg 60

aucgaucgau cgaug 75

<210> 96
<211> 75
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(75)
<223> all purines (A and G) are deoxy, all pyrimidines (C and U) are 2'-O-methyl

<400> 96
gggagaggag agaacguucu acacggggug ggaggggcga gucgcaugga ugcgcugucg 60

aucgaucgau cgaug 75

<210> 97
<211> 75
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(75)
<223> all purines (A and G) are deoxy, all pyrimidines (C and U) are 2'-O-methyl

<400> 97
gggagaggag agaacguucu acucaaugac cgcgcgaggc ucugggagag ggcgcugucg 60

aucgaucgau cgaug 75

<210> 98
<211> 75
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic template

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(75)
<223> all purines (A and G) are deoxy, all pyrimidines (C and U) are 2'-O-methyl

<220>
<221> misc_feature
<222> (23)..(52)
<223> n is a, u, c, or g

<400> 98
gggagaggag agaacguucu acnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnggucgauc 60

gaucgaucau cgaug 75

<210> 99
<211> 39
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic primer

<400> 99
taatacgact cactataggg agaggagaga acgttctac 39

<210> 100
<211> 22
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic primer

<400> 100
catcgatgat cgatcgatcg ac 22

<210> 101
<211> 22
<212> RNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic fixed region

<400> 101
gggagaggag agaacguucu ac 22

<210> 102
<211> 22
<212> RNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic fixed region

<400> 102
gucgaucgau cgaucaucga ug 22

<210> 103
<211> 75
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(75)
<223> all purines (A and G) are deoxy, all pyrimidines (C and U) are 2'-O-methyl

<400> 103
gggagaggag agaacguucu acaggcaagg caauugggga gugugggugg ggggucgauc 60

gaucgaucau cgaug 75

<210> 104
<211> 75
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(75)

212

<223> all purines (A and G) are deoxy, all pyrimidines (C and U) are 2'-O-methyl

<400> 104
gggagaggag agaacguucu acaggcaagu aauuggggag ugcgggcggg ggggucgauc 60

gaucgaucau cgaug 75

<210> 105
<211> 75
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(75)
<223> all purines (A and G) are deoxy, all pyrimidines (C and U) are 2'-O-methyl

<400> 105
gggagaggag agaacguucu acaaggcggu acgggggagug ugggguuggg ccggucgauc 60

gaucgaucau cgaug 75

<210> 106
<211> 75
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(75)
<223> all purines (A and G) are deoxy, all pyrimidines (C and U) are 2'-O-methyl

<400> 106
gggagaggag agaacguucu acgauauagg cgguacgggg ggaguggggcu ggggucgauc 60

gaucgaucau cgaug 75

<210> 107
<211> 75
<212> DNA
<213> artificial

<220>

<223>

<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(75)
<223> all purines (A and G) are deoxy, all pyrimidines (C and U) are 2'-O-methyl

<400> 107
gggagaggag agaacguucu acaggaaagg cgcuugcggg gggugaggga ggggucgauc 60

gaucgaucau cgaug 75

<210> 108
<211> 74
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(74)
<223> all purines (A and G) are deoxy, all pyrimidines (C and U) are 2'-O-methyl

<400> 108
gggagaggag agaacguucu acaggcgguu acgggggaug cgggugggac aggucgaucg 60

aucgaucauc gaug 74

<210> 109
<211> 74
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(74)
<223> all purines (A and G) are deoxy, all pyrimidines (C and U) are 2'-O-methyl

<400> 109
gggagaggag agaacguucu acaggcaagu aauuggggag ugcgggcggg gggucgaucg 60

aucgaucauc gaug 74

214

<210> 110
<211> 74
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(74)
<223> all purines (A and G) are deoxy, all pyrimidines (C and U) are 2'-O-methyl

<400> 110
gggagaggag agaacguucu acaggcaagu aauuggggag ugcgggcggg gugucgaucg 60

aucgaucauc gaug 74

<210> 111
<211> 76
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(76)
<223> all purines (A and G) are deoxy, all pyrimidines (C and U) are 2'-O-methyl

<400> 111
gggagaggag agaacguucu acaggcaagg caauuggggа gcguugggugg gggggucgau 60

cgaucgauca ucgaug 76

<210> 112
<211> 75
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(75)
<223> all purines (A and G) are deoxy, all pyrimidines (C and U) are 2'-O-methyl

<400> 112
gggagaggag agaacgnucu acaauugcag guggugccgg gggnuggggg cggguogauc 60

gaucgaucau cgaug 75

<210> 113
<211> 73
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(73)
<223> all purines (A and G) are deoxy, all pyrimidines (C and U) are 2'-O-methyl

<400> 113
gggagaggag agaacguucu acaggcucaa aagagggggа ugugggaggg ggucgaucga 60

ucgaucaucg aug 73

<210> 114
<211> 74
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(74)
<223> all purines (A and G) are deoxy, all pyrimidines (C and U) are 2'-O-methyl

<400> 114
gggagaggag agaacgnucu acaggcgcag ccagcgggga gugagggugg gggucgaucg 60

aucgaucauc gaug 74

<210> 115
<211> 74
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(74)
<223> all purines (A and G) are deoxy, all pyrimidines (C and U) are 2'-O-methyl

<400> 115
gggagaggag agaacguucu acaggccgau gaggggagc aguggguggg gggucgaucg 60

aucgaucauc gaug 74

<210> 116
<211> 75
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(75)
<223> all purines (A and G) are deoxy, all pyrimidines (C and U) are 2'-O-methyl

<400> 116
gggagaggag agaacguucu acuagugagg cgguaacggg gggugagggu ggggucgauc 60

gaucgaucau cgaug 75

<210> 117
<211> 76
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(76)
<223> all purines (A and G) are deoxy, all pyrimidines (C and U) are 2'-O-methyl

<400> 117
gggagaggag agaacguucu acagguaggc aagauauugg gggaagcggg uggggucgau 60

cgaucgauca ucgaug 76

<210> 118
<211> 75
<212> DNA

<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(75)
<223> all purines (A and G) are deoxy, all pyrimidines (C and U) are 2'-O-methyl

<400> 118
gggagaggag agaacguucu acacauggcu cgaaagaggg gcgugagggu ggggucgauc 60

gaucgaucau cgaug 75

<210> 119
<211> 76
<212> RNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic template

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(76)
<223> all purines (A and G) are 2'-OH, all pyrimidines are 2'-fluoro

<220>
<221> misc_feature
<222> (18)..(57)
<223> n is a, u, c, or g

<400> 119
ggagcgcacu cagccacnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnuuu 60

cgaccucucu gcuagc 76

<210> 120
<211> 34
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic primer

<400> 120
taatacgact cactatagga gcgcactcag ccac 34

<210> 121
<211> 19

<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic primer

<400> 121
gctagcagag aggtcgaaa 19

<210> 122
<211> 17
<212> RNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic fixed region

<400> 122
ggagcgcacu cagccac 17

<210> 123
<211> 19
<212> RNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic fixed region

<400> 123
uuucgaccuc ucugcuagc 19

<210> 124
<211> 75
<212> RNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(75)
<223> all purines (A and G) are 2'-OH, all pyrimidines (C and U) are 2'-fluoro

<400> 124
ggagcgcacu cagccacagg uggcuuaaua cuguaaagac gugcgcgcag agggauuuuc 60

gaccucucug cuagc 75

<210> 125
<211> 76

279

<212> RNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(76)
<223> all purines (A and G) are 2'-OH, all pyrimidines (C and U) are 2'-fluoro

<400> 125
ggagcgcacu cagccaccgu aauucacaag gucccugagu gcaggguugu auguuuguuu 60

cgaccucucu gcuagc 76

<210> 126
<211> 76
<212> RNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(76)
<223> all purines (A and G) are 2'-OH, all pyrimidines (C and U) are 2'-fluoro

<400> 126
ggagcgcacu cagccacucu acucgauaua guuuaucgag ccggugguag auuaugauuu 60

cgaccucucu gcuagc 76

<210> 127
<211> 75
<212> RNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(75)
<223> all purines (A and G) are 2'-OH, all pyrimidines (C and U) are 2'-fluoro

<400> 127
ggagcgcacu cagccacgcc uacaauucac ugugauauau cgaauuauag cccuggcuuc 60

220

gaccucucug cuagc 75

<210> 128
<211> 76
<212> RNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(76)
<223> all purines (A and G) are 2'-OH, all pyrimidines (C and U) are 2'-fluoro

<400> 128
ggagcgcacu cagccaccgg cuuaauaucc aauaggaacg uucgcucuga gcaggcguuu 60

cgaccucucu gcuagc 76

<210> 129
<211> 76
<212> RNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(76)
<223> all purines (A and G) are 2'-OH, all pyrimidines (C and U) are 2'-fluoro

<400> 129
ggagcgcacu cagccacagc ucgguggcuu aauaucuaug ugaacgugcg caacagcuuu 60

cgaccucucu gcuagc 76

<210> 130
<211> 76
<212> RNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base

<222> (1)..(76)
<223> all purines (A and G) are 2'-OH, all pyrimidines (C and U) are 2'-fluoro

<400> 130
ggagcgcacu cagccaccuu gggcuuaaua ccuaucggau gugcgccuag cacggaauuu 60

cgaccucucu gcuagc 76

<210> 131
<211> 76
<212> RNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(76)
<223> all purines (A and G) are 2'-OH, all pyrimidines (C and U) are 2'-fluoro

<220>
<221> misc_feature
<222> (46)..(46)
<223> n is a, u, c, or g

<400> 131
ggagcgcacu cagccacggu uuacuuccgu ggcaauauug accucncucu agacagguuu 60

cgaccucucu gcuagc 76

<210> 132
<211> 76
<212> RNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(76)
<223> all purines (A and G) are 2'-OH, all pyrimidines (C and U) are 2'-fluoro

<400> 132
ggagcgcacu cagccaccug ggaaaaucug ggucccugag uucuaacagc agagauuuuu 60

cgaccucucu gcuagc 76

272

<210> 133
<211> 76
<212> RNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(76)
<223> all purines (A and G) are 2'-OH, all pyrimidines (C and U) are 2'-fluoro

<220>
<221> misc_feature
<222> (12)..(12)
<223> n is a,u, c or g

<220>
<221> misc_feature
<222> (62)..(62)
<223> n is a,u, c or g

<400> 133
ggagcgcacu cngccacuuc ggaauaucgu ugucuucugg gugagcaugc guugagguuu 60

cnaccucucu gcuagc 76

<210> 134
<211> 76
<212> RNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(76)
<223> all purines (A and G) are 2'-OH, all pyrimidines (C and U) are 2'-fluoro

<220>
<221> misc_feature
<222> (61)..(61)
<223> n is a, u, c, or g

<400> 134
ggagcgcacu cagccacugg ggaacaucuc augucucuga ccgcucuugc aguagaauuu 60

ngaccucucu gcuagc 76

<210> 135
<211> 60
<212> RNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(60)
<223> all purines (A and G) are 2'-OH, all pyrimidines (C and U) are 2'-fluoro

<400> 135
ggagaucaua cacaagaagu uuuuugugcu cugaguacuc agcguccgua agggaucucc 60

<210> 136
<211> 48
<212> RNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(48)
<223> all purines (A and G) are 2'-OH, all pyrimidines (C and U) are 2'-fluoro

<400> 136
ggagucugag uacucagcgu ccguaaggga uaugcuccgc cagacucc 48

<210> 137
<211> 39
<212> RNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(39)
<223> all purines (A and G) are 2'-OH, all pyrimidines (C and U) are 2'-fluoro

<400> 137
ggaguuacuc agcguccgua agggauaugc uccgacucc 39

224

<210> 138
<211> 50
<212> RNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(50)
<223> all purines (A and G) are 2'-OH, all pyrimidines (C and U) are 2'-fluoro

<400> 138
ggagucugag uacucagcgu cocgagaggg gauaugcucc gccagacucc 50

<210> 139
<211> 61
<212> RNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(61)
<223> all purines (A and G) are 2'-OH, all pyrimidines (C and U) are 2'-fluoro

<400> 139
ggagcauaca caagaaguuu uuugugcucu gaguacucag cguccguaag ggauaugcuc 60

c 61

<210> 140
<211> 51
<212> RNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(51)
<223> all purines (A and G) are 2'-OH, all pyrimidines (C and U) are 2'-fluoro

<400> 140
ggaguacgcc gaaaggcgcu cugaguacuc agcguccgua agggauacuc c 51

225

<210> 141
<211> 65
<212> RNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(65)
<223> all purines (A and G) are 2'-OH, all pyrimidines (C and U) are 2'-fluoro

<400> 141
ggagcgaauc auacacaaga agugcuucau gcggcaaacu gcaugacguc gaauagauau 60

gcucc 65

<210> 142
<211> 55
<212> RNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(55)
<223> all purines (A and G) are 2'-OH, all pyrimidines (C and U) are 2'-fluoro

<400> 142
ggaucauaca caagaagugc uucaugcggc aaacugcaug acgucgaaua gaucc 55

<210> 143
<211> 47
<212> RNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(47)
<223> all purines (A and G) are 2'-OH, all pyrimidines (C and U) are 2'-fluoro

<400> 143
ggaucauaca caagaagugc uucacgaaag ugacgucgaa uagaucc 47

<210> 144
<211> 60
<212> RNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(60)
<223> all purines (A and G) are 2'-OH, all pyrimidines (C and U) are 2'-fluoro

<400> 144
ggagcauaca caagaagugc uucaugcggc aaacugcaug acgucgaaua gauaugcucc 60

<210> 145
<211> 46
<212> RNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(46)
<223> all purines (A and G) are 2'-OH, all pyrimidines (C and U) are 2'-fluoro

<400> 145
ggaguacaca agaagugcuu ccgaaaggac gucgaauaga uacucc 46

<210> 146
<211> 30
<212> RNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(30)
<223> all purines (A and G) are 2'-OH, all pyrimidines (C and U) are 2'-fluoro

227

<400> 146
gguuaaaucu caucgucccc guuuggggau 30

<210> 147
<211> 57
<212> RNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(57)
<223> all purines (A and G) are 2'-OH, all pyrimidines (C and U) are 2'-fluoro

<400> 147
ggacauacac aagaugugcu ugaguuaaau cucaucguca ccguuugggg auauguc 57

<210> 148
<211> 47
<212> RNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(47)
<223> all purines (A and G) are 2'-OH, all pyrimidines (C and U) are 2'-fluoro

<400> 148
ggcauacacg agagugcugu cgaaagacuc ggccgagagg cuaugcc 47

<210> 149
<211> 47
<212> RNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(47)
<223> all purines (A and G) are 2'-OH, all pyrimidines (C and U) are 2'-fluoro

229

<400> 149
ggcauacgcg agagcgcugg cgaaagccuc ggccgagagg cuaugcc 47

<210> 150
<211> 43
<212> RNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(43)
<223> all purines (A and G) are 2'-OH, all pyrimidines (C and U) are 2'-fluoro

<400> 150
ggauacccga gagggcuggc gaaagccucg gcgagagcua ucc 43

<210> 151
<211> 47
<212> RNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(47)
<223> all purines (A and G) are 2'-OH, all pyrimidines (C and U) are 2'-fluoro

<400> 151
ggguacgccg aaaggcgcuu ccgaaaggac guccguaagg gauaccc 47

<210> 152
<211> 49
<212> RNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(49)
<223> all purines (A and G) are 2'-OH, all pyrimidines (C and U) are 2'-fluoro

229

<400> 152
ggaguacgcc gaaaggcgcu uccgaaagga cguccguaag ggauacucc 49

<210> 153
<211> 42
<212> RNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(42)
<223> all purines (A and G) are 2'-OH, all pyrimidines (C and U) are 2'-fluoro

<400> 153
ggaaucauac cgagagguau uaccccgaaa ggggaccauu cc 42

<210> 154
<211> 48
<212> RNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(48)
<223> all purines (A and G) are 2'-OH, all pyrimidines (C and U) are 2'-fluoro

<400> 154
ggaaucauac acaagagugu aunaccccca acccaggggg accauucc 48

<210> 155
<211> 57
<212> RNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(57)
<223> all purines (A and G) are 2'-OH, all pyrimidines (C and U) are 2'-fluoro

<400> 155
ggaagaaugg ucggaaucuc uggcgccacg cugaguauag acggaagcuc cgccaga 57

<210> 156
<211> 39
<212> RNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(39)
<223> all purines (A and G) are 2'-OH, all pyrimidines (C and U) are 2'-fluoro

<400> 156
ggaggcgcca cgcugaguau agacggaagc uccgccucc 39

<210> 157
<211> 58
<212> RNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(58)
<223> all purines (A and G) are 2'-OH, all pyrimidines (C and U) are 2'-fluoro

<400> 157
ggacacaaga gauguauuca ggcgguccgc auugauguca guuaugcgua gcuocgcc 58

<210> 158
<211> 38
<212> RNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(38)
<223> all purines (A and G) are 2'-OH, all pyrimidines (C and U) are 2'-fluoro

231

<400> 158
ggcgguccgc auugauguca guuaugcgua gcuccgcc 38

<210> 159
<211> 37
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(37)
<223> all purines (A and G) are deoxy, all pyrimidines (C and U) are 2'-O-methyl

<400> 159
acagcgccgg ugggcgggca uuggguggau gcgcugu 37

<210> 160
<211> 32
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(32)
<223> all purines (A and G) are deoxy, all pyrimidines (C and U) are 2'-O-methyl

<400> 160
gcgccggugg gcgggcaccg gguggaugcg cc 32

<210> 161
<211> 35
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(35)
<223> all purines (A and G) are deoxy, all pyrimidines (C and U) are 2'-O-methyl

232

<400> 161
acagcgccgg uguuuucauu ggguggaugc gcugu 35

<210> 162
<211> 28
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(28)
<223> all purines (A and G) are deoxy, all pyrimidines (C and U) are 2'-O-methyl

<400> 162
ggcaaguaau uggggagugc gggcgggg 28

<210> 163
<211> 25
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(25)
<223> all purines (A and G) are deoxy, all pyrimidines (C and U) are 2'-O-methyl

<400> 163
cuacaaggcg guacggggag ugugg 25

<210> 164
<211> 30
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(30)
<223> all purines (A and G) are deoxy, all pyrimidines (C and U) are 2'-O-methyl

<400> 164
ggcgguacgg ggaguguggg uuggggccgg 30

<210> 165
<211> 36
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(36)
<223> all purines (A and G) are deoxy, all pyrimidines (C and U) are 2'-O-methyl

<400> 165
cgauauaggc gguacggggg gagugggcug gggucg 36

<210> 166
<211> 31
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(31)
<223> all purines (A and G) are deoxy, all pyrimidines (C and U) are 2'-O-methyl

<400> 166
uaauuggggа gugcgggcgg ggggucgauc g 31

<210> 167
<211> 27
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(27)
<223> all purines (A and G) are deoxy, all pyrimidines (C and U) are 2'-O-methyl

234

<400> 167
gguggggagu gcgggcgggg ggucgcc 27

<210> 168
<211> 35
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(35)
<223> all purines (A and G) are deoxy, all pyrimidines (C and U) are 2'-O-methyl

<400> 168
acaggcaagg uaauugggga gugcgggcgg ggugu 35

<210> 169
<211> 35
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(35)
<223> all purines (A and G) are deoxy, all pyrimidines (C and U) are 2'-O-methyl

<400> 169
ccaggcaagg uaauugggga gugcgggcgg ggugg 35

<210> 170
<211> 29
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(29)
<223> all purines (A and G) are deoxy, all pyrimidines (C and U) are 2'-O-methyl

<400> 170
ggcaagguaa uugggaagug ugggcgggg 29

<210> 171
<211> 29
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(29)
<223> all purines (A and G) are deoxy, all pyrimidines (C and U) are 2'-O-methyl

<400> 171
ggcaagguaa uuggguagug agggcgggg 29

<210> 172
<211> 29
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(29)
<223> all purines (A and G) are deoxy, all pyrimidines (C and U) are 2'-O-methyl

<400> 172
ggcaagguaa uuggggagug cgggcuggg 29

<210> 173
<211> 29
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(29)
<223> all purines (A and G) are deoxy, all pyrimidines (C and U) are 2'-O-methyl

<400> 173
ggcaagguaa uugggaagug ugggcuggg 29

<210> 174
<211> 29
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(29)
<223> all purines (A and G) are deoxy, all pyrimidines (C and U) are 2'-O-methyl

<400> 174
ggcaagguaa uuggguagug agggcuggg 29

<210> 175
<211> 35
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(35)
<223> all purines (A and G) are deoxy, all pyrimidines (C and U) are 2'-O-methyl

<400> 175
acaggcaagg uaauugggua gugagggcug ggugu 35

<210> 176
<211> 41
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(40)
<223> all purines (A and G) are deoxy, all pyrimidines (C and U) are 2'-O-methyl

<220>
<221> misc_feature
<222> (41)..(41)
<223> n at position 41 is an inverted orientation deoxy thymidine (3'-3' linked)

<400> 176
gauguuggca aguaauuggg gagugcgggc gggguucauc n 41

<210> 177
<211> 34
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(34)
<223> all purines (A and G) are deoxy, all pyrimidines (C and U) are 2'-O-methyl

<400> 177
acaggcaagu aauuggggag ugcgggcggg gugu 34

<210> 178
<211> 34
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(34)
<223> all purines (A and G) are deoxy, all pyrimidines (C and U) are 2'-O-methyl

<400> 178
ccaggcaagu aauuggggag ugcgggcggg gugg 34

<210> 179
<211> 25
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(25)
<223> all purines (A and G) are deoxy, all pyrimidines (C and U) are 2'-O-methyl

<400> 179
ggcgguuacg ggggaugcgg guggg 25

<210> 180
<211> 30
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(30)
<223> all purines (A and G) are deoxy, all pyrimidines (C and U) are 2'-O-methyl

<400> 180
ggcgguuacg ggggaugcgg gugggacagg 30

<210> 181
<211> 26
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(26)
<223> all purines (A and G) are deoxy, all pyrimidines (C and U) are 2'-O-methyl

<400> 181
ggcaaguaau uggggagugc gggcgg 26

<210> 182
<211> 32
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

239

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(32)
<223> all purines (A and G) are deoxy, all pyrimidines (C and U) are 2'-O-methyl

<400> 182
acaggcaagu aauuggggag ugcgggcggu gu 32

<210> 183
<211> 28
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(28)
<223> all purines (A and G) are deoxy, all pyrimidines (C and U) are 2'-O-methyl

<400> 183
ggcgguacgg ggaguguggg uuggggcc 28

<210> 184
<211> 28
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(28)
<223> all purines (A and G) are deoxy, all pyrimidines (C and U) are 2'-O-methyl

<400> 184
ggcgguacgg ggaguguggg cuggggcc 28

<210> 185
<211> 22
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

24

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(22)
<223> all purines (A and G) are deoxy, all pyrimidines (C and U) are 2'-O-methyl

<400> 185
gguacgggga guguggguug gg 22

<210> 186
<211> 22
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(22)
<223> all purines (A and G) are deoxy, all pyrimidines (C and U) are 2'-O-methyl

<400> 186
gguacgggga gugugggcug gg 22

<210> 187
<211> 27
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(27)
<223> all purines (A and G) are deoxy, all pyrimidines (C and U) are 2'-O-methyl

<400> 187
ggcgguacgg ggaguguggg uugggcc 27

<210> 188
<211> 27
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(27)
<223> all purines (A and G) are deoxy, all pyrimidines (C and U) are 2'-O-methyl

<400> 188
ggcgguacgg ggaguguggg cugggcc 27

<210> 189
<211> 21
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(21)
<223> all purines (A and G) are deoxy, all pyrimidines (C and U) are 2'-O-methyl

<400> 189
gguacgggga guguggguug g 21

<210> 190
<211> 21
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(21)
<223> all purines (A and G) are deoxy, all pyrimidines (C and U) are 2'-O-methyl

<400> 190
gguacgggga gugugggcug g 21

<210> 191
<211> 28
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(28)
<223> all purines (A and G) are deoxy, all pyrimidines (C and U) are 2'-O-methyl

<400> 191
ggcgguacgg ggggaguggg cuggggguc 28

<210> 192
<211> 27
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(27)
<223> all purines (A and G) are deoxy, all pyrimidines (C and U) are 2'-O-methyl

<400> 192
ggcgguacgg ggggaguggg cuggguc 27

<210> 193
<211> 28
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(28)
<223> all purines (A and G) are deoxy, all pyrimidines (C and U) are 2'-O-methyl

<400> 193
ggcgguacgg ggagaguggg cuggggguc 28

<210> 194
<211> 22
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(22)
<223> all purines (A and G) are deoxy, all pyrimidines (C and U) are 2'-O-methyl

<400> 194
gguacggggg gagugggcug gg 22

<210> 195
<211> 21
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(21)
<223> all purines (A and G) are deoxy, all pyrimidines (C and U) are 2'-O-methyl

<400> 195
gguacggggg gagugggcug g 21

<210> 196
<211> 22
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(22)
<223> all purines (A and G) are deoxy, all pyrimidines (C and U) are 2'-O-methyl

<400> 196
gguacgggga gagugggcug gg 22

<210> 197
<211> 25
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(25)
<223> all purines (A and G) are deoxy, all pyrimidines (C and U) are 2'-O-methyl

<400> 197
ggcgguacgg ggggaguggg cuggg 25

<210> 198
<211> 25
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(25)
<223> all purines (A and G) are deoxy, all pyrimidines (C and U) are 2'-O-methyl

<400> 198
ggcgguacgg ggaguguggg uuggg 25

<210> 199
<211> 43
<212> RNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(43)
<223> all purines (A and G) are 2'-OH, all pyrimidines (C and U) are 2'-fluoro

<400> 199
gggcacucag ccacaggugg cuuaauacug uaaagacgug ccc 43

<210> 200
<211> 48
<212> RNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(48)
<223> all purines (A and G) are 2'-OH, all pyrimidines (C and U) are 2'-fluoro

<400> 200
ggagcgcacu cagccaccgg cuuaauaucc aauaggaacg uucgcucu 48

<210> 201
<211> 48
<212> RNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(48)
<223> all purines (A and G) are 2'-OH, all pyrimidines (C and U) are 2'-fluoro

<400> 201
gggcacucag ccacagcucg guggcuuaau aucuauguga acgugccc 48

<210> 202
<211> 43
<212> RNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(43)
<223> all purines (A and G) are 2'-OH, all pyrimidines (C and U) are 2'-fluoro

<400> 202
gggcacucag ccaccuuggg cuuaauaccu aucggaugug ccc 43

<210> 203
<211> 35
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

246

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(35)
<223> all purines (A and G) are deoxy, all pyrimidines (C and U) are 2'-O-methyl

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(2)
<223> n at position 2 is a phosphorothioate linker

<400> 203
ancaggcaag taattgggga gtgcgggcgg ggtgt 35

<210> 204
<211> 35
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(35)
<223> all purines (A and G) are deoxy, all pyrimidines (C and U) are 2'-O-methyl

<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(3)
<223> n at position 3 is a phosphorothioate linker

<400> 204
acnaggcaag uaauugggga gugcgggcgg ggugu 35

<210> 205
<211> 35
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(35)
<223> all purines (A and G) are deoxy, all pyrimidines (C and U) are 2'-O-methyl

<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(7)

<223> n at position 7 is a phosphorothioate linker

<400> 205
acaggcnaag uaauugggga gugcgggcgg ggugu 35

<210> 206
<211> 35
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(35)
<223> all purines (A and G) are deoxy, all pyrimidines (C and U) are 2'-O-methyl

<220>
<221> misc_feature
<222> (8)..(8)
<223> n at position 8 is a phosphorothioate linker

<400> 206
acaggcanag uaauugggga gugcgggcgg ggugu 35

<210> 207
<211> 35
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(35)
<223> all purines (A and G) are deoxy, all pyrimidines (C and U) are 2'-O-methyl

<220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(9)
<223> n at position 9 is a phosphorothioate linker

<400> 207
acaggcaang uaauugggga gugcgggcgg ggugu 35

<210> 208
<211> 35
<212> DNA

<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(35)
<223> all purines (A and G) are deoxy, all pyrimidines (C and U) are 2'-O-methyl

<220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(10)
<223> n at position 10 is a phosphorothioate linker

<400> 208
acaggcaagn uaauuggggа gugcgggcgg ggugu 35

<210> 209
<211> 35
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(35)
<223> all purines (A and G) are deoxy, all pyrimidines (C and U) are 2'-O-methyl

<220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(11)
<223> n at position 11 is a phosphorothioate linker

<400> 209
acaggcaagu naauuggggа gugcgggcgg ggugu 35

<210> 210
<211> 35
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(35)

<223> all purines (A and G) are deoxy, all pyrimidines (C and U) are 2'-O-methyl

<220>
<221> misc_feature
<222> (12)..(12)
<223> n at position 12 is a phosphorothioate linker

<400> 210
acaggcaagu anauuggggа gugcgggcgg ggugu 35

<210> 211
<211> 35
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(35)
<223> all purines (A and G) are deoxy, all pyrimidines (C and U) are 2'-O-methyl

<220>
<221> misc_feature
<222> (13)..(13)
<223> n at position 13 is a phosphorothioate linker

<400> 211
acaggcaagu aanuuggggа gugcgggcgg ggugu 35

<210> 212
<211> 35
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(35)
<223> all purines (A and G) are deoxy, all pyrimidines (C and U) are 2'-O-methyl

<220>
<221> misc_feature
<222> (14)..(14)
<223> n at position 14 is a phosphorothioate linker

<400> 212

acaggcaagu aauuugggga gugcgggcgg ggugu 35

<210> 213
<211> 35
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(35)
<223> all purines (A and G) are deoxy, all pyrimidines (C and U) are 2'-O-methyl

<220>
<221> misc_feature
<222> (15)..(15)
<223> n at position 15 is a phosphorothioate linker

<400> 213
acaggcaagu aauunngggga gugcgggcgg ggugu 35

<210> 214
<211> 35
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(35)
<223> all purines (A and G) are deoxy, all pyrimidines (C and U) are 2'-O-methyl

<220>
<221> misc_feature
<222> (19)..(19)
<223> n at position 19 is a phosphorothioate linker

<400> 214
acaggcaagu aauuggggnna gugcgggcgg ggugu 35

<210> 215
<211> 35
<212> DNA
<213> artificial

<220>

<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(35)
<223> all purines (A and G) are deoxy, all pyrimidines (C and U) are 2'-O-methyl

<220>
<221> misc_feature
<222> (20)..(20)
<223> n at position 20 is a phosphorothioate linker

<400> 215
acaggcaagu aauuggggan gugcgggcgg ggugu 35

<210> 216
<211> 35
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(35)
<223> all purines (A and G) are deoxy, all pyrimidines (C and U) are 2'-O-methyl

<220>
<221> misc_feature
<222> (21)..(21)
<223> n at position 21 is a phosphorothioate linker

<400> 216
acaggcaagu aauuggggag nugcgggcgg ggugu 35

<210> 217
<211> 35
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(35)
<223> all purines (A and G) are deoxy, all pyrimidines (C and U) are 2'-O-methyl

<220>
<221> misc_feature
<222> (22)..(22)
<223> n at position 22 is a phosphorothioate linker

<400> 217
acaggcaagu aauuggggag ungcgggcgg ggugu 35

<210> 218
<211> 35
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(35)
<223> all purines (A and G) are deoxy, all pyrimidines (C and U) are 2'-O-methyl

<220>
<221> misc_feature
<222> (23)..(23)
<223> n at position 23 is a phosphorothioate linker

<400> 218
acaggcaagu aauuggggag ugncgggcgg ggugu 35

<210> 219
<211> 35
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(35)
<223> all purines (A and G) are deoxy, all pyrimidines (C and U) are 2'-O-methyl

<220>
<221> misc_feature
<222> (27)..(27)
<223> n at position 27 is a phosphorothioate linker

<400> 219
acaggcaagu aauuggggag ugcgggncgg ggugu 35

152
253

<210> 220
<211> 35
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(35)
<223> all purines (A and G) are deoxy, all pyrimidines (C and U) are 2'-O-methyl

<220>
<221> misc_feature
<222> (28)..(28)
<223> n at position 28 is a phosphorothioate linker

<400> 220
acaggcaagu aaunggggag ugcgggcngg ggugu 35

<210> 221
<211> 35
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(35)
<223> all purines (A and G) are deoxy, all pyrimidines (C and U) are 2'-O-methyl

<220>
<221> misc_feature
<222> (29)..(29)
<223> n at position 29 is a phosphorothioate linker

<400> 221
acaggcaagu aaunggggag ugcgggcgng ggugu 35

<210> 222
<211> 35
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

252
254

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(35)
<223> all purines (A and G) are deoxy, all pyrimidines (C and U) are 2'-O-methyl

<220>
<221> misc_feature
<222> (33)..(33)
<223> n at position 33 is a phosphorothioate linker

<400> 222
acaggcaagu aauuggggag ugcgggcggg gungu 35

<210> 223
<211> 35
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(35)
<223> all purines (A and G) are deoxy, all pyrimidines (C and U) are 2'-O-methyl

<220>
<221> misc_feature
<222> (34)..(34)
<223> n at position 34 is a phosphorothioate linker

<400> 223
acaggcaagu aauuggggag ugcgggcggg gugnu 35

<210> 224
<211> 35
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(34)
<223> all purines (A and G) are deoxy, all pyrimidines (C and U) are 2'-O-methyl

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

<223> n at position 35 is an inverted orientation deoxy thymidine (3'-3' linked)

<400> 224
acaggcaagu aauuggggag ugcgggcggg gugun 35

<210> 225
<211> 35
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(34)
<223> all purines (A and G) are deoxy, except at position 1, wherein adenosine is 2'-O-methyl; all pyrimidines (C and U) are 2'-O-methyl

<220>
<221> misc_feature
<222> (35)..(35)
<223> n at position 35 is an inverted orientation deoxy thymidine (3'-3' linked)

<400> 225
acaggcaagu aauuggggag ugcgggcggg gugun 35

<210> 226
<211> 35
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(34)
<223> all purines (A and G) are deoxy, except at position 3, wherein adenosine is 2'-O-methyl; all pyrimidines (C and U) are 2'-O-methyl

<220>
<221> misc_feature
<222> (35)..(35)
<223> n at position 35 is an inverted orientation deoxy thymidine (3'-3' linked)

<400> 226
acaggcaagu aauuggggag ugcgggcggg gugun 35

<210> 227
<211> 35
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(34)
<223> all purines (A and G) are deoxy, except at position 4, wherein guanosine is 2'-O-methyl; all pyrimidines (C and U) are 2'-O-methyl

<220>
<221> misc_feature
<222> (35)..(35)
<223> n at position 35 is an inverted orientation deoxy thymidine (3'-3' linked)

<400> 227
acaggcaagu aauuggggag ugcgggcggg gugun 35

<210> 228
<211> 35
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(34)
<223> all purines (A and G) are deoxy, except at position 5, wherein guanosine is 2'-O-methyl; all pyrimidines (C and U) are 2'-O-methyl

<220>
<221> misc_feature
<222> (35)..(35)
<223> n at position 35 is an inverted orientation deoxy thymidine (3'-3' linked)

<400> 228
acaggcaagu aauuggggag ugcgggcggg gugun 35

<210> 229
<211> 35
<212> DNA

<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(34)
<223> all purines (A and G) are deoxy, except at position 7, wherein adenosine is 2'-O-methyl; all pyrimidines (C and U) are 2'-O-methyl

<220>
<221> misc_feature
<222> (35)..(35)
<223> n at position 35 is an inverted orientation deoxy thymidine (3'-3' linked)

<400> 229
acaggcaagu aauuggggag ugcgggcggg gugun 35

<210> 230
<211> 35
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(34)
<223> all purines (A and G) are deoxy, except at position 8, wherein adenosine is 2'-O-methyl; all pyrimidines (C and U) are 2'-O-methyl

<220>
<221> misc_feature
<222> (35)..(35)
<223> n at position 35 is an inverted orientation deoxy thymidine (3'-3' linked)

<400> 230
acaggcaagu aauuggggag ugcgggcggg gugun 35

<210> 231
<211> 35
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(34)
<223> all purines (A and G) are deoxy, except at position 9, wherein guanosine is 2'-O-methyl; all pyrimidines (C and U) are 2'-O-methyl

<220>
<221> misc_feature
<222> (35)..(35)
<223> n at position 35 is an inverted orientation deoxy thymidine (3'-3' linked)

<400> 231
acaggcaagu aauuggggag ugcgggcggg gugun 35

<210> 232
<211> 35
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(34)
<223> all purines (A and G) are deoxy, except at position 11, wherein adenosine is 2'-O-methyl; all pyrimidines (C and U) are 2'-O-methyl

<220>
<221> misc_feature
<222> (35)..(35)
<223> n at position 35 is an inverted orientation deoxy thymidine (3'-3' linked)

<400> 232
acaggcaagu aauuggggag ugcgggcggg gugun 35

<210> 233
<211> 35
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(34)
<223> all purines (A and G) are deoxy, except at position 12, wherein

259

adenosine is 2'-O-methyl; all pyrimidines (C and U) are 2'-O-methyl

<220>
<221> misc_feature
<222> (35)..(35)
<223> n at position 35 is an inverted orientation deoxy thymidine (3'-3' linked)

<400> 233
acaggcaagu aauuggggag ugcgggcggg gugun 35

<210> 234
<211> 35
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(34)
<223> all purines (A and G) are deoxy, except at position 15, wherein guanosine is 2'-O-methyl; all pyrimidines (C and U) are 2'-O-methyl

<220>
<221> misc_feature
<222> (35)..(35)
<223> n at position 35 is an inverted orientation deoxy thymidine (3'-3' linked)

<400> 234
acaggcaagu aauuggggag ugcgggcggg gugun 35

<210> 235
<211> 35
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(34)
<223> all purines (A and G) are deoxy, except at position 16, wherein guanosine is 2'-O-methyl; all pyrimidines (C and U) are 2'-O-methyl

<220>
<221> misc_feature

<222> (35)..(35)
<223> n at position 35 is an inverted orientation deoxy thymidine (3'-3' linked)

<400> 235
acaggcaagu aauuggggag ugcgggcggg gugun 35

<210> 236
<211> 35
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(34)
<223> all purines (A and G) are deoxy, except at position 17, wherein guanosine is 2'-O-methyl; all pyrimidines (C and U) are 2'-O-methyl

<220>
<221> misc_feature
<222> (35)..(35)
<223> n at position 35 is an inverted orientation deoxy thymidine (3'-3' linked)

<400> 236
acaggcaagu aauuggggag ugcgggcggg gugun 35

<210> 237
<211> 35
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(34)
<223> all purines (A and G) are deoxy, except at position 18, wherein guanosine is 2'-O-methyl; all pyrimidines (C and U) are 2'-O-methyl

<220>
<221> misc_feature
<222> (35)..(35)
<223> n at position 35 is an inverted orientation deoxy thymidine (3'-3' linked)

<400> 237

acaggcaagu aauuggggag ugcgggcggg gugun 35

<210> 238
<211> 35
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(34)
<223> all purines (A and G) are deoxy, except at position 19, wherein adenosine is 2'-O-methyl; all pyrimidines (C and U) are 2'-O-methyl

<220>
<221> misc_feature
<222> (35)..(35)
<223> n at position 35 is an inverted orientation deoxy thymidine (3'-3' linked)

<400> 238
acaggcaagu aauuggggag ugcgggcggg gugun 35

<210> 239
<211> 35
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(34)
<223> all purines (A and G) are deoxy, except at position 20, wherein guanosine is 2'-O-methyl; all pyrimidines (C and U) are 2'-O-methyl

<220>
<221> misc_feature
<222> (35)..(35)
<223> n at position 35 is an inverted orientation deoxy thymidine (3'-3' linked)

<400> 239
acaggcaagu aauuggggag ugcgggcggg gugun 35

<210> 240
<211> 35

<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(34)
<223> all purines (A and G) are deoxy, except at position 22, wherein guanosine is 2'-O-methyl; all pyrimidines (C and U) are 2'-O-methyl

<220>
<221> misc_feature
<222> (35)..(35)
<223> n at position 35 is an inverted orientation deoxy thymidine (3'-3' linked)

<400> 240
acaggcaagu aauuggggag ugcgggcggg gugun 35

<210> 241
<211> 35
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(34)
<223> all purines (A and G) are deoxy, except at position 24, wherein guanosine is 2'-O-methyl; all pyrimidines (C and U) are 2'-O-methyl

<220>
<221> misc_feature
<222> (35)..(35)
<223> n at position 35 is an inverted orientation deoxy thymidine (3'-3' linked)

<400> 241
acaggcaagu aauuggggag ugcgggcggg gugun 35

<210> 242
<211> 35
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

263

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(34)
<223> all purines (A and G) are deoxy, except at position 25, wherein guanosine is 2'-O-methyl; all pyrimidines (C and U) are 2'-O-methyl

<220>
<221> misc_feature
<222> (35)..(35)
<223> n at position 35 is an inverted orientation deoxy thymidine (3'-3' linked)

<400> 242
acaggcaagu aauuggggag ugcgggcggg gugun 35

<210> 243
<211> 35
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(34)
<223> all purines (A and G) are deoxy, except at position 26, wherein guanosine is 2'-O-methyl; all pyrimidines (C and U) are 2'-O-methyl

<220>
<221> misc_feature
<222> (35)..(35)
<223> n at position 35 is an inverted orientation deoxy thymidine (3'-3' linked)

<400> 243
acaggcaagu aauuggggag ugcgggcggg gugun 35

<210> 244
<211> 35
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(34)

<223> all purines (A and G) are deoxy, except at position 28, wherein guanosine is 2'-O-methyl; all pyrimidines (C and U) are 2'-O-methyl

<220>
<221> misc_feature
<222> (35)..(35)
<223> n at position 35 is an inverted orientation deoxy thymidine (3'-3' linked)

<400> 244
acaggcaagu aauuggggag ugcgggcggg gugun 35

<210> 245
<211> 35
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(34)
<223> all purines (A and G) are deoxy, except at position 29, wherein guanosine is 2'-O-methyl; all pyrimidines (C and U) are 2'-O-methyl

<220>
<221> misc_feature
<222> (35)..(35)
<223> n at position 35 is an inverted orientation deoxy thymidine (3'-3' linked)

<400> 245
acaggcaagu aauuggggag ugcgggcggg gugun 35

<210> 246
<211> 35
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(34)
<223> all purines (A and G) are deoxy, except at position 30 wherein guanosine is 2'-O-methyl; all pyrimidines (C and U) are 2'-O-methyl

<220>

<221> misc_feature
<222> (35)..(35)
<223> n at position 35 is an inverted orientation deoxy thymidine (3'-3' linked)

<400> 246
acaggcaagu aauuggggag ugcgggcggg gugun 35

<210> 247
<211> 35
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(34)
<223> all purines (A and G) are deoxy, except at position 31 wherein guanosine is 2'-O-methyl; all pyrimidines (C and U) are 2'-O-methyl

<220>
<221> misc_feature
<222> (35)..(35)
<223> n at position 35 is an inverted orientation deoxy thymidine (3'-3' linked)

<400> 247
acaggcaagu aauuggggag ugcgggcggg gugun 35

<210> 248
<211> 35
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(34)
<223> all purines (A and G) are deoxy, except at position 33 wherein guanosine is 2'-O-methyl; all pyrimidines (C and U) are 2'-O-methyl

<220>
<221> misc_feature
<222> (35)..(35)
<223> n at position 35 is an inverted orientation deoxy thymidine (3'-3' linked)

<400> 248
acaggcaagu aauuggggag ugcgggcggg gugun 35

<210> 249
<211> 35
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(34)
<223> all purines (A and G) are deoxy, except at positions 1 and 3, wherein adenosine is 2'-O-methyl and position 33 wherein guanosine is 2'-O-methyl; all pyrimidines (C and U) are 2'-O-methyl

<220>
<221> misc_feature
<222> (35)..(35)
<223> n at position 35 is an inverted orientation deoxy thymidine (3'-3' linked)

<400> 249
acaggcaagu aauuggggag ugcgggcggg gugun 35

<210> 250
<211> 35
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(34)
<223> all purines (A and G) are deoxy, except at positions 7 and 8, wherein adenosine is 2'-O-methyl and position 15 wherein guanosine is 2'-O-methyl; all pyrimidines (C and U) are 2'-O-methyl

<220>
<221> misc_feature
<222> (35)..(35)
<223> n at position 35 is an inverted orientation deoxy thymidine (3'-3' linked)

<400> 250
acaggcaagu aauuggggag ugcgggcggg gugun 35

<210> 251
<211> 36
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(35)
<223> all purines (A and G) are deoxy, all pyrmimidines (C and U) are 2'-O-methyl

<220>
<221> misc_feature
<222> (4)..(4)
<223> n at position 4 is a phosphorothioate linker

<220>
<221> misc_feature
<222> (36)..(36)
<223> n at position 36 is an inverted orientation deoxy thymidine (3'-3' linked)

<400> 251
acanggcaag uaauuggggg gugcgggcgg ggugun 36

<210> 252
<211> 36
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(35)
<223> all purines (A and G) are deoxy, all pyrmidines (C and U) are 2'-O-methyl

<220>
<221> misc_feature
<222> (5)..(5)
<223> n at position 5 is a phosphorothioate linker

<220>
<221> misc_feature
<222> (36)..(36)
<223> n at position 36 is an inverted orientation deoxy thymidine (3'-3' linked)

<400> 252
acagngcaag uaauugggga gugcgggcgg ggugun 36

<210> 253
<211> 36
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(35)
<223> all purines (A and G) are deoxy, all pyrmidines (C and U) are 2'-O-methyl

<220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(6)
<223> n at position 6 is a phosphorothioate linker

<220>
<221> misc_feature
<222> (36)..(36)
<223> n at position 36 is an inverted orientation deoxy thymidine (3'-3' linked)

<400> 253
acaggncaag uaauugggga gugcgggcgg ggugun 36

<210> 254
<211> 36
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(35)
<223> all purines (A and G) are deoxy, all pyrmidines (C and U) are 2'-O-methyl

<220>
<221> misc_feature
<222> (16)..(16)
<223> n at position 16 is a phosphorothioate linker

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

<223> n at position 36 is an inverted orientation deoxy thymidine (3'-3' linked)

<400> 254
acaggcaagu aaaugnggga gugcgggcgg ggugun 36

<210> 255
<211> 36
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(35)
<223> all purines (A and G) are deoxy, all pyrmidines (C and U) are 2'-O-methyl

<220>
<221> misc_feature
<222> (17)..(17)
<223> n at position 17 is a phosphorothioate linker

<220>
<221> misc_feature
<222> (36)..(36)
<223> n at position 36 is an inverted orientation deoxy thymidine (3'-3' linked)

<400> 255
acaggcaagu aaauggngga gugcgggcgg ggugun 36

<210> 256
<211> 36
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(35)
<223> all purines (A and G) are deoxy, all pyrmidines (C and U) are 2'-O-methyl

<220>
<221> misc_feature
<222> (18)..(18)
<223> n at position 18 is a phosphorothioate linker

892
270

<220>
<221> misc_feature
<222> (36)..(36)
<223> n at position 36 is an inverted orientation deoxy thymidine (3'-3' linked)

<400> 256
acaggcaagu aauuggggna gugcgggcgg ggugun 36

<210> 257
<211> 36
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(35)
<223> all purines (A and G) are deoxy, all pyrmidines (C and U) are 2'-O-methyl

<220>
<221> misc_feature
<222> (24)..(24)
<223> n at position 24 is a phosphorothioate linker

<220>
<221> misc_feature
<222> (36)..(36)
<223> n at position 36 is an inverted orientation deoxy thymidine (3'-3' linked)

<400> 257
acaggcaagu aauuggggag ugcnggggcgg ggugun 36

<210> 258
<211> 36
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(35)
<223> all purines (A and G) are deoxy, all pyrmidines (C and U) are 2'-O-methyl

<220>
<221> misc_feature

<222> (25)..(25)
<223> n at position 25 is a phosphorothioate linker

<220>
<221> misc_feature
<222> (36)..(36)
<223> n at position 36 is an inverted orientation deoxy thymidine (3'-3' linked)

<400> 258
acaggcaagu aauuggggag ugcgnggcgg ggugun 36

<210> 259
<211> 36
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(35)
<223> all purines (A and G) are deoxy, all pyrmidines (C and U) are 2'-O-methyl

<220>
<221> misc_feature
<222> (26)..(26)
<223> n at position 26 is a phosphorothioate linker

<220>
<221> misc_feature
<222> (36)..(36)
<223> n at position 36 is an inverted orientation deoxy thymidine (3'-3' linked)

<400> 259
acaggcaagu aauuggggag ugcggngcgg ggugun 36

<210> 260
<211> 36
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(35)
<223> all purines (A and G) are deoxy, all pyrmidines (C and U) are 2'-O-methyl

<220>
<221> misc_feature
<222> (30)..(30)
<223> n at position 30 is a phosphorothioate linker

<220>
<221> misc_feature
<222> (36)..(36)
<223> n at position 36 is an inverted orientation deoxy thymidine (3'-3' linked)

<400> 260
acaggcaagu aauuggggag ugcgggcggn ggugun 36

<210> 261
<211> 36
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(35)
<223> all purines (A and G) are deoxy, all pyrmidines (C and U) are 2'-O-methyl

<220>
<221> misc_feature
<222> (31)..(31)
<223> n at position 31 is a phosphorothioate linker

<220>
<221> misc_feature
<222> (36)..(36)
<223> n at position 36 is an inverted orientation deoxy thymidine (3'-3' linked)

<400> 261
acaggcaagu aauuggggag ugcgggcggg ngugun 36

<210> 262
<211> 36
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base

<222> (1)..(35)
<223> all purines (A and G) are deoxy, all pyrmidines (C and U) are 2'-O-methyl

<220>
<221> misc_feature
<222> (32)..(32)
<223> n at position 32 is a phosphorothioate linker

<220>
<221> misc_feature
<222> (36)..(36)
<223> n at position 36 is an inverted orientation deoxy thymidine (3'-3' linked)

<400> 262
acaggcaagu aauuggggag ugcgggcggg gnugun 36

<210> 263
<211> 41
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(40)
<223> all purines (A and G) are deoxy, all pyrmidines (C and U) are 2'-O-methyl

<220>
<221> misc_feature
<222> (12)..(12)
<223> n at position 12 is a phosphorothioate linker

<220>
<221> misc_feature
<222> (21)..(21)
<223> n at position 21 is a phosphorothioate linker

<220>
<221> misc_feature
<222> (23)..(23)
<223> n at position 23 is a phosphorothioate linker

<220>
<221> misc_feature
<222> (25)..(25)
<223> n at position 25 is a phosphorothioate linker

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

<223> n at position 27 is a phosphorothioate linker

<220>
<221> misc_feature
<222> (32)..(32)
<223> n at position 32 is a phosphorothioate linker

<220>
<221> misc_feature
<222> (41)..(41)
<223> n at position 41 is an inverted orientation deoxy thymidine (3'-3' linked)

<400> 263
acaggcaagu anauugggga ngmungncgg gncgggggugu n 41

<210> 264
<211> 37
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(36)
<223> all purines (A and G) are deoxy, all pyrmidines (C and U) are 2'-O-methyl

<220>
<221> misc_feature
<222> (4)..(4)
<223> n at position 4 is a PEG spacer

<220>
<221> misc_feature
<222> (33)..(33)
<223> n at position 33 is a PEG spacer

<220>
<221> misc_feature
<222> (37)..(37)
<223> n at position 37 is an inverted orientation deoxy thymidine (3'-3' linked)

<400> 264
acanggcaag uaauugggga gugcgggcgg ggmugun 37

<210> 265
<211> 39
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(38)
<223> all purines (A and G) are deoxy, except at positions 2 and 38, wherein guanosine is 2'-O-methyl; all pyrmidines (C and U) are 2'-O-methyl

<220>
<221> misc_feature
<222> (5)..(5)
<223> n at position 5 is a PEG spacer

<220>
<221> misc_feature
<222> (34)..(34)
<223> n at position 34 is a PEG spacer

<220>
<221> misc_feature
<222> (39)..(39)
<223> n at position 39 is an inverted orientation deoxy thymidine (3'-3' linked)

<400> 265
cgcanggcaa guaauugggg agugcgggcg ggnugcgn 39

<210> 266
<211> 29
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(28)
<223> all purines (A and G) are deoxy, all pyrimidines (C and U) are 2'-O-methyl

<220>
<221> misc_feature
<222> (29)..(29)
<223> n at position 29 is an inverted orientation deoxy thymidine (3'-3' linked)

<400> 266
ggcaaguaau uggggagugc gggcggggn 29

<210> 267

<211> 29
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(28)
<223> all purines (A and G) are deoxy, except at positions 4 ad 5, wherein adenosine is 2'-O-methyl, and position 12 wherein guanosine is 2'-O-methyl; all pyrimidines (C and U) are 2'-O-methyl

<220>
<221> misc_feature
<222> (29)..(29)
<223> n at position 29 is an inverted orientation deoxy thymidine (3'-3' linked)

<400> 267
ggcaaguaau uggggagugc gggcggggn 29

<210> 268
<211> 35
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(34)
<223> all purines (A and G) are deoxy, all pyrimidines (C and U) are 2'-O-methyl

<220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(9)
<223> n at position 9 is a phosphorothioate linker

<220>
<221> misc_feature
<222> (18)..(18)
<223> n at position 18 is a phosphorothioate linker

<220>
<221> misc_feature
<222> (20)..(20)
<223> n at position 20 is a phosphorothioate linker

<220>

<221> misc_feature
<222> (22)..(22)
<223> n at position 22 is a phosphorothioate linker

<220>
<221> misc_feature
<222> (24)..(24)
<223> n at position 24 is a phosphorothioate linker

<220>
<221> misc_feature
<222> (29)..(29)
<223> n at position 29 is a phosphorothioate linker

<220>
<221> misc_feature
<222> (35)..(35)
<223> n at position 35 is an inverted orientation deoxy thymidine (3'-3' linked)

<400> 268
ggcaaguana uuggggangn ungnogggnc ggggn 35

<210> 269
<211> 35
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(34)
<223> all purines (A and G) are deoxy, except at positions 4 and 5, wherein adenosine is 2'-O-methyl, and position 13, wherein guanosine is 2'-O-methyl; all pyrimidines (C and U) are 2'-O-methyl

<220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(9)
<223> n at position 9 is a phosphorothioate linker

<220>
<221> misc_feature
<222> (18)..(18)
<223> n at position 18 is a phosphorothioate linker

<220>
<221> misc_feature
<222> (20)..(20)
<223> n at position 20 is a phosphorothioate linker

<220>

<221> misc_feature
<222> (22)..(22)
<223> n at position 22 is a phosphorothioate linker

<220>
<221> misc_feature
<222> (24)..(24)
<223> n at position 24 is a phosphorothioate linker

<220>
<221> misc_feature
<222> (29)..(29)
<223> n at position 29 is a phosphorothioate linker

<220>
<221> misc_feature
<222> (35)..(35)
<223> n at position 35 is an inverted orientation deoxy thymidine (3'-3' linked)

<400> 269
ggcaaguana uuggggnangn ungncgggnc ggggn 35

<210> 270
<211> 35
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(34)
<223> all purines (A and G) are deoxy, except at position 1 wherein adenosine is 2'-O-methyl, and position 33, wherein guanosine is 2'-O-methyl; all pyrimidines (C and U) are 2'-O-methyl

<220>
<221> misc_feature
<222> (35)..(35)
<223> n at position 35 is an inverted orientation deoxy thymidine (3'-3' linked)

<400> 270
acaggcaagu aauuggggag ugcgggcggg gugun 35

<210> 271
<211> 35
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(34)
<223> all purines (A and G) are deoxy, except at positions 8 and 11 wherein adenosine is 2'-O-methyl, and position 9, wherein guanosine is 2'-O-methyl; all pyrimidines (C and U) are 2'-O-methyl

<220>
<221> misc_feature
<222> (35)..(35)
<223> n at position 35 is an inverted orientation deoxy thymidine (3'-3' linked)

<400> 271
acaggcaagu aauuggggag ugcgggcggg gugun 35

<210> 272
<211> 35
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(34)
<223> all purines (A and G) are deoxy, except at position 19 wherein adenosine is 2'-O-methyl, and positions 18, 20, and 22, wherein guanosine is 2'-O-methyl; all pyrimidines (C and U) are 2'-O-methyl

<220>
<221> misc_feature
<222> (35)..(35)
<223> n at position 35 is an inverted orientation deoxy thymidine (3'-3' linked)

<400> 272
acaggcaagu aauuggggag ugcgggcggg gugun 35

<210> 273
<211> 35
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>

<221> modified_base
<222> (1)..(34)
<223> all purines (A and G) are deoxy, except at positions 26, 28, and 29, wherein guanosine is 2'-O-methyl; all pyrimidines (C and U) are 2'-O-methyl

<220>
<221> misc_feature
<222> (35)..(35)
<223> n at position 35 is an inverted orientation deoxy thymidine (3'-3' linked)

<400> 273
acaggcaagu aauuggggag ugcgggcggg gugun 35

<210> 274
<211> 35
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(34)
<223> all pyrimidines (C and U) are 2'-O-methyl

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(34)
<223> all purines (A and G) are deoxy, except at positions 1, 8, 11, and 19, wherein adenosine is 2'-O-methyl, and positions 9, 18, 20, 22, 26, 28, 29, and 33, wherein guanosine is 2'-O-methyl

<220>
<221> misc_feature
<222> (35)..(35)
<223> n at position 35 is an inverted orientation deoxy thymidine (3'-3' linked)

<400> 274
acaggcaagu aauuggggag ugcgggcggg gugun 35

<210> 275
<211> 35
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>

<221> modified_base
<222> (1)..(34)
<223> all purines (A and G) are deoxy, except at positions 16, 17, 24, 25, 30, and 31, wherein guanosine is 2'-O-methyl; all pyrimidines are 2'-O-methyl

<220>
<221> misc_feature
<222> (35)..(35)
<223> n at position 35 is an inverted orientation deoxy thymidine (3'-3' linked)

<400> 275
acaggcaagu aauuggggag ugcgggcggg gugun 35

<210> 276
<211> 35
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(34)
<223> all purines (A and G) are 2'-O-methyl, except at positions 3, 7, and 12, wherein adenosine is deoxy; and positions 4, 5, and 15, wherein guanosine is deoxy

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(34)
<223> all pyrimidines are 2'-O-methyl

<220>
<221> misc_feature
<222> (35)..(35)
<223> n at position 35 is an inverted orientation deoxy thymidine (3'-3' linked)

<400> 276
acaggcaagu aauuggggag ugcgggcggg gugun 35

<210> 277
<211> 35
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>

<221> modified_base
<222> (1)..(34)
<223> all purines (A and G) are deoxy, all pyrimidines (C and U) are 2'-O-methyl

<220>
<221> misc_feature
<222> (4)..(4)
<223> n at position 4 is deoxy inosine

<220>
<221> misc_feature
<222> (35)..(35)
<223> n at position 35 is an inverted orientation deoxy thymidine (3'-3' linked)

<400> 277
acangcaagu aauuggggag ugcgggcggg gugun 35

<210> 278
<211> 35
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(34)
<223> all purines (A and G) are deoxy, all pyrimidines (C and U) are 2'-O-methyl

<220>
<221> misc_feature
<222> (5)..(5)
<223> n at position 5 is deoxy inosine

<220>
<221> misc_feature
<222> (35)..(35)
<223> n at position 35 is an inverted orientation deoxy thymidine (3'-3' linked)

<400> 278
acagncaagu aauuggggag ugcgggcggg gugun 35

<210> 279
<211> 35
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(34)
<223> all purines (A and G) are deoxy, all pyrimidines (C and U) are 2'-O-methyl

<220>
<221> misc_feature
<222> (4)..(5)
<223> n at positions 4 and 5 are deoxy inosine

<220>
<221> misc_feature
<222> (35)..(35)
<223> n at position 35 is an inverted orientation deoxy thymidine (3'-3' linked)

<400> 279
acanncaagu aauuggggag ugcgggcggg gugun 35

<210> 280
<211> 35
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(34)
<223> all purines (A and G) are deoxy, all pyrimidines (C and U) are 2'-O-methyl

<220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(9)
<223> n at position 9 is deoxy inosine

<220>
<221> misc_feature
<222> (35)..(35)
<223> n at position 35 is an inverted orientation deoxy thymidine (3'-3' linked)

<400> 280
acaggcaanu aauuggggag ugcgggcggg gugun 35

<210> 281
<211> 35
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(34)
<223> all purines (A and G) are deoxy, all pyrimidines (C and U) are 2'-O-methyl

<220>
<221> misc_feature
<222> (15)..(15)
<223> n at position 15 is deoxy inosine

<220>
<221> misc_feature
<222> (35)..(35)
<223> n at position 35 is an inverted orientation deoxy thymidine (3'-3' linked)

<400> 281
acaggcaagu aauungggag ugcgggcggg gugun 35

<210> 282
<211> 35
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(34)
<223> all purines (A and G) are deoxy, all pyrimidines (C and U) are 2'-O-methyl

<220>
<221> misc_feature
<222> (16)..(16)
<223> n at position 16 is deoxy inosine

<220>
<221> misc_feature
<222> (35)..(35)
<223> n at position 35 is an inverted orientation deoxy thymidine (3'-3' linked)

<400> 282
acaggcaagu aauugnggag ugcgggcggg gugun 35

<210> 283

<211> 35
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(34)
<223> all purines (A and G) are deoxy, all pyrimidines (C and U) are 2'-O-methyl

<220>
<221> misc_feature
<222> (17)..(17)
<223> n at position 17 is deoxy inosine

<220>
<221> misc_feature
<222> (35)..(35)
<223> n at position 35 is an inverted orientation deoxy thymidine (3'-3' linked)

<400> 283
acaggcaagu aauuggngag ugcgggcggg gugun 35

<210> 284
<211> 35
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(34)
<223> all purines (A and G) are deoxy, all pyrimidines (C and U) are 2'-O-methyl

<220>
<221> misc_feature
<222> (18)..(18)
<223> n at position 18 is deoxy inosine

<220>
<221> misc_feature
<222> (35)..(35)
<223> n at position 35 is an inverted orientation deoxy thymidine (3'-3' linked)

<400> 284
acaggcaagu aauugggnag ugcgggcggg gugun 35

<210> 285
<211> 35
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(34)
<223> all purines (A and G) are deoxy, all pyrimidines (C and U) are 2'-O-methyl

<220>
<221> misc_feature
<222> (15)..(16)
<223> n at positions 15 and 16 are deoxy inosine

<220>
<221> misc_feature
<222> (35)..(35)
<223> n at position 35 is an inverted orientation deoxy thymidine (3'-3' linked)

<400> 285
acaggcaagu aauunnggag ugcgggcggg gugun 35

<210> 286
<211> 35
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(34)
<223> all purines (A and G) are deoxy, all pyrimidines (C and U) are 2'-O-methyl

<220>
<221> misc_feature
<222> (16)..(17)
<223> n at positions 16 and 17 are deoxy inosine

<220>
<221> misc_feature
<222> (35)..(35)
<223> n at position 35 is an inverted orientation deoxy thymidine (3'-3' linked)

<400> 286
acaggcaagu aauugnngag ugcgggcggg gugun 35

<210> 287
<211> 35
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(34)
<223> all purines (A and G) are deoxy, all pyrimidines (C and U) are 2'-O-methyl

<220>
<221> misc_feature
<222> (17)..(18)
<223> n at positions 17 and 18 are deoxy inosine

<220>
<221> misc_feature
<222> (35)..(35)
<223> n at position 35 is an inverted orientation deoxy thymidine (3'-3' linked)

<400> 287
acaggcaagu aauuggnnag ugcgggcggg gugun 35

<210> 288
<211> 35
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(34)
<223> all purines (A and G) are deoxy, all pyrimidines (C and U) are 2'-O-methyl

<220>
<221> misc_feature
<222> (15)..(18)
<223> n at positions 15, 16, 17, and 18 are deoxy inosine

<220>
<221> misc_feature

<222> (35)..(35)
<223> n at position 35 is an inverted orientation deoxy thymidine (3'-3' linked)

<400> 288
acaggcaagu aauunnnnag ugcgggcggg gugun 35

<210> 289
<211> 35
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(34)
<223> all purines (A and G) are deoxy, all pyrimidines (C and U) are 2'-O-methyl

<220>
<221> misc_feature
<222> (20)..(20)
<223> n at position 20 is deoxy inosine

<220>
<221> misc_feature
<222> (35)..(35)
<223> n at position 35 is an inverted orientation deoxy thymidine (3'-3' linked)

<400> 289
acaggcaagu aauuggggan ugcgggcggg gugun 35

<210> 290
<211> 35
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(34)
<223> all purines (A and G) are deoxy, all pyrimidines (C and U) are 2'-O-methyl

<220>
<221> misc_feature
<222> (22)..(22)
<223> n at position 22 is deoxy inosine

<220>
<221> misc_feature
<222> (35)..(35)
<223> n at position 35 is an inverted orientation deoxy thymidine (3'-3' linked)

<400> 290
acaggcaagu aauuggggag uncgggcggg gugun 35

<210> 291
<211> 35
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(34)
<223> all purines (A and G) are deoxy, all pyrimidines (C and U) are 2'-O-methyl

<220>
<221> misc_feature
<222> (24)..(24)
<223> n at position 24 is deoxy inosine

<220>
<221> misc_feature
<222> (35)..(35)
<223> n at position 35 is an inverted orientation deoxy thymidine (3'-3' linked)

<400> 291
acaggcaagu aauuggggag ugcnggcggg gugun 35

<210> 292
<211> 35
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(34)
<223> all purines (A and G) are deoxy, all pyrimidines (C and U) are 2'-O-methyl

<220>

<221> misc_feature
<222> (25)..(25)
<223> n at position 25 is deoxy inosine

<220>
<221> misc_feature
<222> (35)..(35)
<223> n at position 35 is an inverted orientation deoxy thymidine (3'-3' linked)

<400> 292
acaggcaagu aauuggggag ugcggngcggg gugun 35

<210> 293
<211> 35
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(34)
<223> all purines (A and G) are deoxy, all pyrimidines (C and U) are 2'-O-methyl

<220>
<221> misc_feature
<222> (26)..(26)
<223> n at position 26 is deoxy inosine

<220>
<221> misc_feature
<222> (35)..(35)
<223> n at position 35 is an inverted orientation deoxy thymidine (3'-3' linked)

<400> 293
acaggcaagu aauuggggag ugcggncggg gugun 35

<210> 294
<211> 35
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(34)
<223> all purines (A and G) are deoxy, all pyrimidines (C and U) are

291

2'-O-methyl

<220>
<221> misc_feature
<222> (24)..(25)
<223> n at positions 24 and 25 are deoxy inosine

<220>
<221> misc_feature
<222> (35)..(35)
<223> n at position 35 is an inverted orientation deoxy thymidine (3'-3' linked)

<400> 294
acaggcaagu aauuggggag ugcnngcggg gugun 35

<210> 295
<211> 35
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(34)
<223> all purines (A and G) are deoxy, all pyrimidines (C and U) are 2'-O-methyl

<220>
<221> misc_feature
<222> (25)..(26)
<223> n at positions 25 and 26 are deoxy inosine

<220>
<221> misc_feature
<222> (35)..(35)
<223> n at position 35 is an inverted orientation deoxy thymidine (3'-3' linked)

<400> 295
acaggcaagu aauuggggag ugcgnncggg gugun 35

<210> 296
<211> 35
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>

<221> modified_base
<222> (1)..(34)
<223> all purines (A and G) are deoxy, all pyrimidines (C and U) are 2'-O-methyl

<220>
<221> misc_feature
<222> (24)..(26)
<223> n at positions 24, 25, and 26 are deoxy inosine

<220>
<221> misc_feature
<222> (35)..(35)
<223> n at position 35 is an inverted orientation deoxy thymidine (3'-3' linked)

<400> 296
acaggcaagu aauuggggag ugcnnncggg gugun 35

<210> 297
<211> 35
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(34)
<223> all purines (A and G) are deoxy, all pyrimidines (C and U) are 2'-O-methyl

<220>
<221> misc_feature
<222> (28)..(28)
<223> n at position 28 is deoxy inosine

<220>
<221> misc_feature
<222> (35)..(35)
<223> n at position 35 is an inverted orientation deoxy thymidine (3'-3' linked)

<400> 297
acaggcaagu aauuggggag ugcgggcngg gugun 35

<210> 298
<211> 35
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(34)
<223> all purines (A and G) are deoxy, all pyrimidines (C and U) are 2'-O-methyl

<220>
<221> misc_feature
<222> (29)..(29)
<223> n at position 29 is deoxy inosine

<220>
<221> misc_feature
<222> (35)..(35)
<223> n at position 35 is an inverted orientation deoxy thymidine (3'-3' linked)

<400> 298
acaggcaagu aauuggggag ugcgggcgng gugun 35

<210> 299
<211> 35
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(34)
<223> all purines (A and G) are deoxy, all pyrimidines (C and U) are 2'-O-methyl

<220>
<221> misc_feature
<222> (30)..(30)
<223> n at position 30 is deoxy inosine

<220>
<221> misc_feature
<222> (35)..(35)
<223> n at position 35 is an inverted orientation deoxy thymidine (3'-3' linked)

<400> 299
acaggcaagu aauuggggag ugcgggcggn gugun 35

<210> 300
<211> 35
<212> DNA
<213> artificial

292
294

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(34)
<223> all purines (A and G) are deoxy, all pyrimidines (C and U) are 2'-O-methyl

<220>
<221> misc_feature
<222> (31)..(31)
<223> n at position 31 is deoxy inosine

<220>
<221> misc_feature
<222> (35)..(35)
<223> n at position 35 is an inverted orientation deoxy thymidine (3'-3' linked)

<400> 300
acaggcaagu aauuggggag ugcgggcggg nugun 35

<210> 301
<211> 35
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(34)
<223> all purines (A and G) are deoxy, all pyrimidines (C and U) are 2'-O-methyl

<220>
<221> misc_feature
<222> (28)..(29)
<223> n at positions 28 and 29 are deoxy inosine

<220>
<221> misc_feature
<222> (35)..(35)
<223> n at position 35 is an inverted orientation deoxy thymidine (3'-3' linked)

<400> 301
acaggcaagu aauuggggag ugcgggcnng gugun 35

<210> 302

<211> 35
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(34)
<223> all purines (A and G) are deoxy, all pyrimidines (C and U) are 2'-O-methyl

<220>
<221> misc_feature
<222> (29)..(30)
<223> n at positions 29 and 30 are deoxy inosine

<220>
<221> misc_feature
<222> (35)..(35)
<223> n at position 35 is an inverted orientation deoxy thymidine (3'-3' linked)

<400> 302
acaggcaagu aauuggggag ugcgggcgnn gugun 35

<210> 303
<211> 35
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(34)
<223> all purines (A and G) are deoxy, all pyrimidines (C and U) are 2'-O-methyl

<220>
<221> misc_feature
<222> (30)..(31)
<223> n at positions 30 and 31 are deoxy inosine

<220>
<221> misc_feature
<222> (35)..(35)
<223> n at position 35 is an inverted orientation deoxy thymidine (3'-3' linked)

<400> 303
acaggcaagu aauuggggag ugcgggcggn nugun 35

<210> 304
<211> 35
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(34)
<223> all purines (A and G) are deoxy, all pyrimidines (C and U) are 2'-O-methyl

<220>
<221> misc_feature
<222> (28)..(31)
<223> n at positions 28, 29, 30 and 31 are deoxy inosine

<220>
<221> misc_feature
<222> (35)..(35)
<223> n at position 35 is an inverted orientation deoxy thymidine (3'-3' linked)

<400> 304
acaggcaagu aauuggggag ugcgggcnnn nugun 35

<210> 305
<211> 35
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(34)
<223> all purines (A and G) are deoxy, all pyrimidines (C and U) are 2'-O-methyl

<220>
<221> misc_feature
<222> (33)..(33)
<223> n at position 33 is deoxy inosine

<220>
<221> misc_feature
<222> (35)..(35)
<223> n at position 35 is an inverted orientation deoxy thymidine (3'-3' linked)

<400> 305
acaggcaagu aauuggggag ugcgggcggg gunun 35

<210> 306
<211> 36
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(35)
<223> all purines (A and G) are deoxy, except at positions 17, 18, 25, 26, 31 and 32, wherein guanosine is 2'-O-methyl; all pyrimidines are 2'-O-methyl

<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(3)
<223> n at position 3 is a phosphorothioate linker

<220>
<221> misc_feature
<222> (36)..(36)
<223> n at position 36 is an inverted orientation deoxy thymidine (3'-3' linked)

<400> 306
acnaggcaag uaauugggga gugcgggcgg ggugun 36

<210> 307
<211> 37
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(36)
<223> all purines (A and G) are deoxy, except at positions 18, 19, 26, 27, 32, and 33, wherein guanosine is 2'-O-methyl; all pyrimidines are 2'-O-methyl

<220>
<221> misc_feature
<222> (4)..(4)
<223> n at position 4 is a phosphorothioate linker

<220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(6)
<223> n at position 6 is a phosphorothioate linker

<220>
<221> misc_feature
<222> (37)..(37)
<223> n at position 37 is an inverted orientation deoxy thymidine (3'-3' linked)

<400> 307
acangngcaa guaauugggg agugcgggcg gggugun 37

<210> 308
<211> 41
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(40)
<223> all purines (A and G) are deoxy, except at positions 22, 23, 30, 31, 36 and 37, wherein guanosine is 2'-O-methyl; all pyrimidines are 2'-O-methyl

<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(7)
<223> n at position 7 is a phosphorothioate linker

<220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(9)
<223> n at position 9 is a phosphorothioate linker

<220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(11)
<223> n at position 11 is a phosphorothioate linker

<220>
<221> misc_feature
<222> (14)..(14)
<223> n at position 14 is a phosphorothioate linker

<220>
<221> misc_feature
<222> (16)..(16)
<223> n at position 16 is a phosphorothioate linker

<220>

<221> misc_feature
<222> (20)..(20)
<223> n at position 20 is a phosphorothioate linker

<220>
<221> misc_feature
<222> (41)..(41)
<223> n at position 41 is an inverted orientation deoxy thymidine (3'-3' linked)

<400> 308
acaggcnana ngunanauun ggggagugog ggcggggugu n 41

<210> 309
<211> 39
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(38)
<223> all purines (A and G) are deoxy, except at positions 16, 17, 28, 29, 34 and 35, wherein guanosine is 2'-O-methyl; all pyrimidines are 2'-O-methyl

<220>
<221> misc_feature
<222> (18)..(18)
<223> n at position 18 is a phosphorothioate linker

<220>
<221> misc_feature
<222> (20)..(20)
<223> n at position 20 is a phosphorothioate linker

<220>
<221> misc_feature
<222> (22)..(22)
<223> n at position 22 is a phosphorothioate linker

<220>
<221> misc_feature
<222> (25)..(25)
<223> n at position 25 is a phosphorothioate linker

<220>
<221> misc_feature
<222> (39)..(39)
<223> n at position 39 is an inverted orientation deoxy thymidine (3'-3' linked)

<400> 309

acaggcaagu aauugggngn angungcggg cggggugun 39

<210> 310
<211> 38
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(37)
<223> all purines (A and G) are deoxy, except at positions 16, 17, 24, 25, 33, and 34, wherein guanosine is 2'-O-methyl; all pyrimidines are 2'-O-methyl

<220>
<221> misc_feature
<222> (26)..(26)
<223> n at position 26 is a phosphorothioate linker

<220>
<221> misc_feature
<222> (29)..(29)
<223> n at position 29 is a phosphorothioate linker

<220>
<221> misc_feature
<222> (31)..(31)
<223> n at position 31 is a phosphorothioate linker

<220>
<221> misc_feature
<222> (38)..(38)
<223> n at position 38 is an inverted orientation deoxy thymidine (3'-3' linked)

<400> 310
acaggcaagu aauuggggag ugcggngcng ngggugun 38

<210> 311
<211> 36
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(35)
<223> all purines (A and G) are deoxy, except at positions 16, 17, 24,

302
301

25, 30 and 31, wherein guanosine is 2'-O-methyl; all pyrimidines are 2'-O-methyl

<220>
<221> misc_feature
<222> (33)..(33)
<223> n at position 33 is a phosphorothioate linker

<220>
<221> misc_feature
<222> (36)..(36)
<223> n at position 36 is an inverted orientation deoxy thymidine (3'-3' linked)

<400> 311
acaggcaagu aauuggggag ugcgggcggg gumgun 36

<210> 312
<211> 52
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(51)
<223> all purines (A and G) are deoxy, except at positions 25, 26, 37, 38, 46 and 47, wherein guanosine is 2'-O-methyl; all pyrimidines are 2'-O-methyl

<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(3)
<223> n at position 3 is a phosphorothioate linker

<220>
<221> misc_feature
<222> (5)..(5)
<223> n at position 5 is a phosphorothioate linker

<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(7)
<223> n at position 7 is a phosphorothioate linker

<220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(10)
<223> n at position 10 is a phosphorothioate linker

<220>
<221> misc_feature
<222> (12)..(12)

302

<223> n at position 12 is a phosphorothioate linker

<220>
<221> misc_feature
<222> (14)..(14)
<223> n at position 14 is a phosphorothioate linker

<220>
<221> misc_feature
<222> (17)..(17)
<223> n at position 17 is a phosphorothioate linker

<220>
<221> misc_feature
<222> (19)..(19)
<223> n at position 19 is a phosphorothioate linker

<220>
<221> misc_feature
<222> (23)..(23)
<223> n at position 23 is a phosphorothioate linker

<220>
<221> misc_feature
<222> (27)..(27)
<223> n at position 27 is a phosphorothioate linker

<220>
<221> misc_feature
<222> (29)..(29)
<223> n at position 29 is a phosphorothioate linker

<220>
<221> misc_feature
<222> (31)..(31)
<223> n at position 31 is a phosphorothioate linker

<220>
<221> misc_feature
<222> (34)..(34)
<223> n at position 34 is a phosphorothioate linker

<220>
<221> misc_feature
<222> (39)..(39)
<223> n at position 39 is a phosphorothioate linker

<220>
<221> misc_feature
<222> (42)..(42)
<223> n at position 42 is a phosphorothioate linker

<220>
<221> misc_feature
<222> (44)..(44)
<223> n at position 44 is a phosphorothioate linker

<220>
<221> misc_feature
<222> (49)..(49)
<223> n at position 49 is a phosphorothioate linker

<220>
<221> misc_feature
<222> (52)..(52)
<223> n at position 52 is an inverted orientation deoxy thymidine (3'-3' linked)

<400> 312
acnangngcn anangunana uungggngna ngungcggng cngngggung un 52

<210> 313
<211> 39
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(38)
<223> all purines (A and G) are 2'-O-methyl, except at positions 4, 9, and 15, wherein adenosine is deoxy, and positions 5, 6, and 19, wherein guanosine is deoxy; all pyrimidines are 2'-O-methyl

<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(3)
<223> n at position 3 is a phosphorothioate linker

<220>
<221> misc_feature
<222> (8)..(8)
<223> n at position 8 is a phosphorothioate linker

<220>
<221> misc_feature
<222> (14)..(14)
<223> n at position 14 is a phosphorothioate linker

<220>
<221> misc_feature
<222> (18)..(18)
<223> n at position 18 is a phosphorothioate linker

<220>
<221> misc_feature
<222> (39)..(39)
<223> n at position 39 is an inverted orientation deoxy thymidine (3'-3' linked)

<400> 313
acnaggcnaa guanauungg ggagugcggg cggggugun 39

<210> 314
<211> 43
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic aptamer

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(42)
<223> all purines (A and G) are 2'-O-methyl, except at positions 4, 9, and 15, and 25 wherein adenosine is deoxy, and positions 5, 6, and 19, 23, 27, and 30 wherein guanosine is deoxy; all pyrimdines are 2'-O-methyl

<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(3)
<223> n at position 3 is a phosphorothioate linker

<220>
<221> misc_feature
<222> (8)..(8)
<223> n at position 8 is a phosphorothioate linker

<220>
<221> misc_feature
<222> (14)..(14)
<223> n at position 14 is a phosphorothioate linker

<220>
<221> misc_feature
<222> (18)..(18)
<223> n at position 18 is a phosphorothioate linker

<220>
<221> misc_feature
<222> (22)..(22)
<223> n at position 22 is a phosphorothioate linker

<220>
<221> misc_feature
<222> (24)..(24)
<223> n at position 24 is a phosphorothioate linker

<220>
<221> misc_feature
<222> (26)..(26)
<223> n at position 26 is a phosphorothioate linker

<220>

<221> misc_feature
<222> (29)..(29)
<223> n at position 29 is a phosphorothioate linker

<220>
<221> misc_feature
<222> (43)..(43)
<223> n at position 43 is an inverted orientation deoxy thymidine (3'-3' linked)

<400> 314
acnaggcnaa guanauungg gngnangung cgggcggggu gun 43

<210> 315
<211> 335
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 315

Met Cys Pro Gln Lys Leu Thr Ile Ser Trp Phe Ala Ile Val Leu Leu
1 5 10 15

Val Ser Pro Leu Met Ala Met Trp Glu Leu Glu Lys Asp Val Tyr Val
20 25 30

Val Glu Val Asp Trp Thr Pro Asp Ala Pro Gly Glu Thr Val Asn Leu
35 40 45

Thr Cys Asp Thr Pro Glu Glu Asp Asp Ile Thr Trp Thr Ser Asp Gln
50 55 60

Arg His Gly Val Ile Gly Ser Gly Lys Thr Leu Thr Ile Thr Val Lys
65 70 75 80

Glu Phe Leu Asp Ala Gly Gln Tyr Thr Cys His Lys Gly Gly Glu Thr
85 90 95

Leu Ser His Ser His Leu Leu Leu His Lys Lys Glu Asn Gly Ile Trp
100 105 110

Ser Thr Glu Ile Leu Lys Asn Phe Lys Asn Lys Thr Phe Leu Lys Cys
115 120 125

Glu Ala Pro Asn Tyr Ser Gly Arg Phe Thr Cys Ser Trp Leu Val Gln
130 135 140

306

Arg Asn Met Asp Leu Lys Phe Asn Ile Lys Ser Ser Ser Ser Ser Pro
145 150 155 160

Asp Ser Arg Ala Val Thr Cys Gly Met Ala Ser Leu Ser Ala Glu Lys
165 170 175

Val Thr Leu Asp Gln Arg Asp Tyr Glu Lys Tyr Ser Val Ser Cys Gln
180 185 190

Glu Asp Val Thr Cys Pro Thr Ala Glu Glu Thr Leu Pro Ile Glu Leu
195 200 205

Ala Leu Glu Ala Arg Gln Gln Asn Lys Tyr Glu Asn Tyr Ser Thr Ser
210 215 220

Phe Phe Ile Arg Asp Ile Ile Lys Pro Asp Pro Pro Lys Asn Leu Gln
225 230 235 240

Met Lys Pro Leu Lys Asn Ser Gln Val Glu Val Ser Trp Glu Tyr Pro
245 250 255

Asp Ser Trp Ser Thr Pro His Ser Tyr Phe Ser Leu Lys Phe Phe Val
260 265 270

Arg Ile Gln Arg Lys Lys Glu Lys Met Lys Glu Thr Glu Glu Gly Cys
275 280 285

Asn Gln Lys Gly Ala Phe Leu Val Glu Lys Thr Ser Thr Glu Val Gln
290 295 300

Cys Lys Gly Gly Asn Val Cys Val Gln Ala Gln Asp Arg Tyr Tyr Asn
305 310 315 320

Ser Ser Cys Ser Lys Trp Ala Cys Val Pro Cys Arg Val Arg Ser
325 330 335

<210> 316
<211> 196
<212> PRT
<213> mus musculus

<400> 316

Met Leu Asp Cys Arg Ala Val Ile Met Leu Trp Leu Leu Pro Trp Val
1 5 10 15

307

Thr Gln Gly Leu Ala Val Pro Arg Ser Ser Ser Pro Asp Trp Ala Gln
20 25 30

Cys Gln Gln Leu Ser Arg Asn Leu Cys Met Leu Ala Trp Asn Ala His
35 40 45

Ala Pro Ala Gly His Met Asn Leu Leu Arg Glu Glu Glu Asp Glu Glu
50 55 60

Thr Lys Asn Asn Val Pro Arg Ile Gln Cys Glu Asp Gly Cys Asp Pro
65 70 75 80

Gln Gly Leu Lys Asp Asn Ser Gln Phe Cys Leu Gln Arg Ile Arg Gln
85 90 95

Gly Leu Ala Phe Tyr Lys His Leu Leu Asp Ser Asp Ile Phe Lys Gly
100 105 110

Glu Pro Ala Leu Leu Pro Asp Ser Pro Met Glu Gln Leu His Thr Ser
115 120 125

Leu Leu Gly Leu Ser Gln Leu Leu Gln Pro Glu Asp His Pro Arg Glu
130 135 140

Thr Gln Gln Met Pro Ser Leu Ser Ser Ser Gln Gln Trp Gln Arg Pro
145 150 155 160

Leu Leu Arg Ser Lys Ile Leu Arg Ser Leu Gln Ala Phe Leu Ala Ile
165 170 175

Ala Ala Arg Val Phe Ala His Gly Ala Ala Thr Leu Thr Glu Pro Leu
180 185 190

Val Pro Thr Ala
195

<210> 317
<211> 215
<212> PRT
<213> mus musculus

<400> 317

308

```
Met Cys Gln Ser Arg Tyr Leu Leu Phe Leu Ala Thr Leu Ala Leu Leu
1               5                  10                  15

Asn His Leu Ser Leu Ala Arg Val Ile Pro Val Ser Gly Pro Ala Arg
            20                  25                  30

Cys Leu Ser Gln Ser Arg Asn Leu Leu Lys Thr Thr Asp Asp Met Val
        35                  40                  45

Lys Thr Ala Arg Glu Lys Leu Lys His Tyr Ser Cys Thr Ala Glu Asp
    50                  55                  60

Ile Asp His Glu Asp Ile Thr Arg Asp Gln Thr Ser Thr Leu Lys Thr
65                  70                  75                  80

Cys Leu Pro Leu Glu Leu His Lys Asn Glu Ser Cys Leu Ala Thr Arg
                85                  90                  95

Glu Thr Ser Ser Thr Thr Arg Gly Ser Cys Leu Pro Pro Gln Lys Thr
            100                 105                 110

Ser Leu Met Met Thr Leu Cys Leu Gly Ser Ile Tyr Glu Asp Leu Lys
        115                 120                 125

Met Tyr Gln Thr Glu Phe Gln Ala Ile Asn Ala Ala Leu Gln Asn His
    130                 135                 140

Asn His Gln Gln Ile Ile Leu Asp Lys Gly Met Leu Val Ala Ile Asp
145                 150                 155                 160

Glu Leu Met Gln Ser Leu Asn His Asn Gly Glu Thr Leu Arg Gln Lys
                165                 170                 175

Pro Pro Val Gly Glu Ala Asp Pro Tyr Arg Val Lys Met Lys Leu Cys
            180                 185                 190

Ile Leu Leu His Ala Phe Ser Thr Arg Val Val Thr Ile Asn Arg Val
        195                 200                 205

Met Gly Tyr Leu Ser Ser Ala
    210                 215
```

309

IN THE INTERNATIONAL BUREAU OF WIPO

International Application No.	:	PCT/US2005/007666
International Filing Date	:	7 March 2005 (07.03.2005)
Earliest Priority Date	:	5 March 2004 (05.03.2004)
Applicant(s)	:	ARCHEMIX CORP.
Title	:	APTAMERS TO THE HUMAN IL-12 CYTOKINE FAMILY AND THEIR USE AS AUTOIMMUNE DISEASE THERAPEUTICS

International Bureau of WIPO
34, Chemin des Columbettes
Geneva
SWITZERLAND

REQUEST FOR RECORDING OF REMOVAL OF APPLICANT/INVENTORS UNDER PCT RULE 92BIS

The undersigned hereby requests that the following change be recorded in the above-identified international application:

Remove:

CLOAD, Sharon T.
7 Granville Road
Cambridge, MA 02138
United States of America
Citizenship: US

310

A copy of the Powers of Attorney are attached.

Favorable action is requested. The International Bureau is invited to contact the undersigned by collect telephone call if further information is required.

Respectfully submitted,

Heidi Erlacher
Jennifer A. Karnakis
MINTZ, LEVIN, COHN, FERRIS,
GLOVSKY and POPEO, P.C.
One Financial Center
Boston, Massachusetts 02111
United States of America
Telephone: 617/542-6000
Facsimile: 617/542-2241

Date: 22 August 2006
Agent Ref.: 23239-578-061

TRA 2190435v.1

Client No. 23239-578-061

311

PCT

POWER OF ATTORNEY

(for several international applications filed under the Patent Cooperation Treaty)

(PCT Rule 90.5)

The undersigned person(s)

SHARON T. CLOAD

hereby appoint(s) the following persons as agents

Kevin Ainsworth	Richard Gervase	Jay Mitchell
Ingrid Beattie	Marvin S. Gittes	Carol H. Peters
William Belanger	James Hall	Matthew Pavao
Charles E. Bell	Ibrahim Hallaj	Michael Renaud
Naomi Biswas	Paul Hayes	Robert J. Sayre
Kathryn Vesco Chelini	Brian P. Hopkins	C. Eric Schulman
Daniel Coughlin	Shane Hunter	Leslie Serunian
Sean M. Coughlin	David E. Johnson	Gregory J. Sieczkiewicz
David F. Crosby	Jennifer Karnakis	Eric Sinn
Caryn DeHoratius	Cynthia Kozakiewicz	Timur Slonim
Ivor R. Elrifi	Richard M. Lehrer	Christina K. Stock
Heidi A. Erlacher	Alison McCarthy	Janine Susan
Flora Feng	Christopher Millikin	Nicholas P. Triano III
Eugene Feher	A. Jason Mirabito	

of

MINTZ, LEVIN, COHN, FERRIS, GLOVSKY and POPEO, P.C.
One Financial Center, Boston, Massachusetts 02111, United States of America
701 Pennsylvania Avenue, N.W., Washington, D.C. 20004, United States of America
One Fountain Square, 11911 Freedom Drive, Reston, Virginia 20190, United States of America
Chrysler Center, 666 Third Avenue, New York, New York 10017, United States of America

to represent the undersigned before all competent International Authorities in connection with the international application identified below:

Title of the invention: **APTAMERS TO THE HUMAN IL-12 CYTOKINE FAMILY AND THEIR USE AS AUTOIMMUNE DISEASE THERAPEUTICS**

International application number: **UNKNOWN**

filed with the United States Patent and Trademark Office as receiving Office and to make or receive payments on behalf of the undersigned.

SHARON T. CLOAD

Date: 3/14/05



TRA 2015825v1

Client No. 23239-578-061

PCT

POWER OF ATTORNEY

(for several international applications filed under the Patent Cooperation Treaty)

(PCT Rule 90.5)

The undersigned person(s)

POOJA SAWHNEY

hereby appoint(s) the following persons as agents

Kevin Ainsworth	Richard Gervase	Jay Mitchell
Ingrid Beattie	Marvin S. Gittes	Carol H. Peters
William Belanger	James Hall	Matthew Pavao
Charles E. Bell	Ibrahim Hallaj	Michael Renaud
Naomi Biswas	Paul Hayes	Robert J. Sayre
Kathryn Vesco Chelini	Brian P. Hopkins	C. Eric Schulman
Daniel Coughlin	Shane Hunter	Leslie Serunian
Sean M. Coughlin	David E. Johnson	Gregory J. Sieczkiewicz
David F. Crosby	Jennifer Karnakis	Eric Sinn
Caryn DeHoratius	Cynthia Kozakiewicz	Timur Slonim
Ivor R. Elrifi	Richard M. Lehrer	Christina K. Stock
Heidi A. Erlacher	Alison McCarthy	Janine Susan
Flora Feng	Christopher Millikin	Nicholas P. Triano III
Eugene Feher	A. Jason Mirabito	

of

MINTZ, LEVIN, COHN, FERRIS, GLOVSKY and POPEO, P.C.
One Financial Center, Boston, Massachusetts 02111, United States of America
701 Pennsylvania Avenue, N.W., Washington, D.C. 20004, United States of America
One Fountain Square, 11911 Freedom Drive, Reston, Virginia 20190, United States of America
Chrysler Center, 666 Third Avenue, New York, New York 10017, United States of America

to represent the undersigned before all competent International Authorities in connection with the international application identified below:

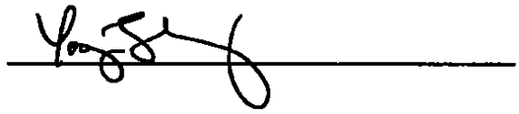
Title of the invention: **APTAMERS TO THE HUMAN IL-12 CYTOKINE FAMILY AND THEIR USE AS AUTOMIMMUNE DISEASE THERAPEUTICS**

International application number: **PCT/US2005/007666**

filed with the United States Patent and Trademark Office as receiving Office and to make or receive payments on behalf of the undersigned.

POOJA SAWHNEY

Date: 3/2/06



TRA 2015825v1

Client No. 23239-578-061

FR 313

PCT

POWER OF ATTORNEY

(for several international applications filed under the Patent Cooperation Treaty)

(PCT Rule 90.5)

The undersigned person(s)

NOBUKO HAMAGUCHI

hereby appoint(s) the following persons as agents

Kevin Ainsworth	Richard Gervase	Jay Mitchell
Ingrid Beattie	Marvin S. Gittes	Carol H. Peters
William Belanger	James Hall	Matthew Pavao
Charles E. Bell	Ibrahim Hallaj	Michael Renaud
Naomi Biswas	Paul Hayes	Robert J. Sayre
Kathryn Vesco Chelini	Brian P. Hopkins	C. Eric Schulman
Daniel Coughlin	Shane Hunter	Leslie Serunian
Sean M. Coughlin	David E. Johnson	Gregory J. Sieczkiewicz
David F. Crosby	Jennifer Karnakis	Eric Sinn
Caryn DeHoratius	Cynthia Kozakiewicz	Timur Slonim
Ivor R. Elrifi	Richard M. Lehrer	Christina K. Stock
Heidi A. Erlacher	Alison McCarthy	Janine Susan
Flora Feng	Christopher Millikin	Nicholas P. Triano III
Eugene Feher	A. Jason Mirabito	

of

MINTZ, LEVIN, COHN, FERRIS, GLOVSKY and POPEO, P.C.
One Financial Center, Boston, Massachusetts 02111, United States of America
701 Pennsylvania Avenue, N.W., Washington, D.C. 20004, United States of America
One Fountain Square, 11911 Freedom Drive, Reston, Virginia 20190, United States of America
Chrysler Center, 666 Third Avenue, New York, New York 10017, United States of America

to represent the undersigned before all competent International Authorities in connection with the international application identified below:

Title of the invention: **APTAMERS TO THE HUMAN IL-12 CYTOKINE FAMILY AND THEIR USE AS AUTOMIMMUNE DISEASE THERAPEUTICS**

International application number: **PCT/US2005/007666**

filed with the United States Patent and Trademark Office as receiving Office and to make or receive payments on behalf of the undersigned.

NOBUKO HAMAGUCHI

Date: Dec 1 '05



TRA 2015825v1

Client No.: 23239-578-061

PCT

POWER OF ATTORNEY

(for several international applications filed under the Patent Cooperation Treaty)

(PCT Rule 90.5)

The undersigned person(s)

JOHN L. DIENER

hereby appoint(s) the following persons as agents

Kevin Ainsworth	Richard Gervase	Jay Mitchell
Ingrid Beattie	Marvin S. Gittes	Carol H. Peters
William Belanger	James Hall	Matthew Pavao
Charles E. Bell	Ibrahim Hallaj	Michael Renaud
Naomi Biswas	Paul Hayes	Robert J. Sayre
Kathryn Vesco Chelini	Brian P. Hopkins	C. Eric Schulman
Daniel Coughlin	Shane Hunter	Leslie Serunian
Sean M. Coughlin	David B. Johnson	Gregory J. Sieczkiewicz
David F. Crosby	Jennifer Karnakis	Eric Sinn
Caryn DeHoratius	Cynthia Kozakiewicz	Timur Slonim
Ivor R. Elrifi	Richard M. Lehrer	Christina K. Stock
Heidi A. Erlacher	Alison McCarthy	Nicholas P. Triano III
Flora Feng	Christopher Millikin	
Eugene Feher	A. Jason Mirabito	

of

MINTZ, LEVIN, COHN, FERRIS, GLOVSKY and POPEO, P.C.
One Financial Center, Boston, Massachusetts 02111, United States of America
701 Pennsylvania Avenue, N.W., Washington, D.C. 20004, United States of America
One Fountain Square, 11911 Freedom Drive, Reston, Virginia 20190, United States of America
Chrysler Center, 666 Third Avenue, New York, New York 10017, United States of America

to represent the undersigned before all competent International Authorities in connection with the international application identified below:

Title of the invention: **APTAMERS TO THE HUMAN IL-12 CYTOKINE FAMILY AND THEIR USE AS AUTOIMMUNE DISEASE THERAPEUTICS**

International application number: **PCT/US2005/007666**

filed with the United States Patent and Trademark Office as receiving Office and to make or receive payments on behalf of the undersigned.

JOHN L. DIENER

Date: 11/22/05

TRA 2033606v1

Client No.: 23239-578-061

315

PCT

POWER OF ATTORNEY

(for several international applications filed under the Patent Cooperation Treaty)

(PCT Rule 90.5)

The undersigned person(s)

ALICIA FERGUSON

hereby appoint(s) the following persons as agents

Kevin Ainsworth	Richard Gervase	Jay Mitchell
Ingrid Beattie	Marvin S. Gittes	Carol H. Peters
William Belanger	James Hall	Matthew Pavao
Charles E. Bell	Ibrahim Hallaj	Michael Renaud
Naomi Biswas	Paul Hayes	Robert J. Sayre
Kathryn Vesco Chelini	Brian P. Hopkins	C. Eric Schulman
Daniel Coughlin	Shane Hunter	Leslie Serunian
Sean M. Coughlin	David E. Johnson	Gregory J. Sieczkiewicz
David F. Crosby	Jennifer Karnakis	Eric Sinn
Caryn DeHoratius	Cynthia Kozakiewicz	Timur Slonim
Ivor R. Elrifi	Richard M. Lehrer	Christina K. Stock
Heidi A. Erlacher	Alison McCarthy	Nicholas P. Triano III
Flora Feng	Christopher Millikin	
Eugene Feher	A. Jason Mirabito	

of

MINTZ, LEVIN, COHN, FERRIS, GLOVSKY and POPEO, P.C.
One Financial Center, Boston, Massachusetts 02111, United States of America
701 Pennsylvania Avenue, N.W., Washington, D.C. 20004, United States of America
One Fountain Square, 11911 Freedom Drive, Reston, Virginia 20190, United States of America
Chrysler Center, 666 Third Avenue, New York, New York 10017, United States of America

to represent the undersigned before all competent International Authorities in connection with the international application identified below:

Title of the invention: **APTAMERS TO THE HUMAN IL-12 CYTOKINE FAMILY AND THEIR USE AS AUTOIMMUNE DISEASE THERAPEUTICS**

International application number: **PCT/US2005/007666**

filed with the United States Patent and Trademark Office as receiving Office and to make or receive payments on behalf of the undersigned.

ALICIA FERGUSON

Date: 11/28/05

Client No.: 23239-578-061

PCT

POWER OF ATTORNEY

(for several international applications filed under the Patent Cooperation Treaty)

(PCT Rule 90.5)

The undersigned person(s)

SARA CHESWORTH KEENE

hereby appoint(s) the following persons as agents

Kevin Ainsworth	Richard Gervase	Jay Mitchell
Ingrid Beattie	Marvin S. Gittes	Carol H. Peters
William Belanger	James Hall	Matthew Pavao
Charles E. Bell	Ibrahim Hallaj	Michael Renaud
Naomi Biswas	Paul Hayes	Robert J. Sayre
Kathryn Vesco Chelini	Brian P. Hopkins	C. Eric Schulman
Daniel Coughlin	Shane Hunter	Leslie Serunian
Sean M. Coughlin	David E. Johnson	Gregory J. Sieczkiewicz
David F. Crosby	Jennifer Karnakis	Eric Sinn
Caryn DeHoratius	Cynthia Kozakiewicz	Timur Slonim
Ivor R. Elrifi	Richard M. Lehrer	Christina K. Stock
Heidi A. Erlacher	Alison McCarthy	Nicholas P. Triano III
Flora Feng	Christopher Millikin	
Eugene Feher	A. Jason Mirabito	

of

MINTZ, LEVIN, COHN, FERRIS, GLOVSKY and POPEO, P.C.
One Financial Center, Boston, Massachusetts 02111, United States of America
701 Pennsylvania Avenue, N.W., Washington, D.C. 20004, United States of America
One Fountain Square, 11911 Freedom Drive, Reston, Virginia 20190, United States of America
Chrysler Center, 666 Third Avenue, New York, New York 10017, United States of America

to represent the undersigned before all competent International Authorities in connection with the international application identified below:

Title of the invention: **APTAMERS TO THE HUMAN IL-12 CYTOKINE FAMILY AND THEIR USE AS AUTOIMMUNE DISEASE THERAPEUTICS**

International application number: **PCT/US2005/007666**

filed with the United States Patent and Trademark Office as receiving Office and to make or receive payments on behalf of the undersigned.

SARA CHESWORTH KEENE

Date: 11/21/05

Client No. 23239-578-061

PCT

POWER OF ATTORNEY

(for several international applications filed under the Patent Cooperation Treaty)

(PCT Rule 90.5)

The undersigned person(s)

H.A. DANIEL LAGASSÉ

hereby appoint(s) the following persons as agents

Kevin Ainsworth	Richard Gervase	Jay Mitchell
Ingrid Beattie	Marvin S. Gittes	Carol H. Peters
William Belanger	James Hall	Matthew Pavao
Charles E. Bell	Ibrahim Hallaj	Michael Renaud
Naomi Biswas	Paul Hayes	Robert J. Sayre
Kathryn Vesco Chelini	Brian P. Hopkins	C. Eric Schulman
Daniel Coughlin	Shane Hunter	Leslie Serunian
Sean M. Coughlin	David E. Johnson	Gregory J. Sieczkiewicz
David F. Crosby	Jennifer Karnakis	Eric Sinn
Caryn DeHoratius	Cynthia Kozakiewicz	Timur Slonim
Ivor R. Elrifi	Richard M. Lehrer	Christina K. Stock
Heidi A. Erlacher	Alison McCarthy	Janine Susan
Flora Feng	Christopher Millikin	Nicholas P. Triano III
Eugene Feher	A. Jason Mirabito	

of

MINTZ, LEVIN, COHN, FERRIS, GLOVSKY and POPEO, P.C.
One Financial Center, Boston, Massachusetts 02111, United States of America
701 Pennsylvania Avenue, N.W., Washington, D.C. 20004, United States of America
One Fountain Square, 11911 Freedom Drive, Reston, Virginia 20190, United States of America
Chrysler Center, 666 Third Avenue, New York, New York 10017, United States of America

to represent the undersigned before all competent International Authorities in connection with the international application identified below:

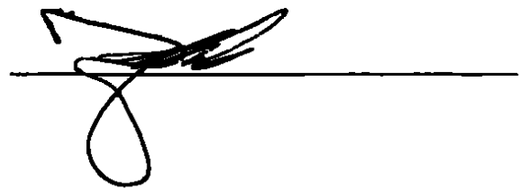
Title of the invention: **APTAMERS TO THE HUMAN IL-12 CYTOKINE FAMILY AND THEIR USE AS AUTOMIMMUNE DISEASE THERAPEUTICS**

International application number: **PCT/US2005/007666**

filed with the United States Patent and Trademark Office as receiving Office and to make or receive payments on behalf of the undersigned.

H.A. DANIEL LAGASSÉ

Date: 1/22/15



TRA 2015825v1

Client No.: 23239-578-061

PCT

POWER OF ATTORNEY

(for several international applications filed under the Patent Cooperation Treaty)

(PCT Rule 90.5)

The undersigned person(s)

KRISTIN THOMPSON

hereby appoint(s) the following persons as agents

Kevin Ainsworth	Richard Gervase	Jay Mitchell
Ingrid Beattie	Marvin S. Gittes	Carol H. Peters
William Belanger	James Hall	Matthew Pavao
Charles E. Bell	Ibrahim Hallaj	Michael Renaud
Naomi Biswas	Paul Hayes	Robert J. Sayre
Kathryn Vesco Chelini	Brian P. Hopkins	C. Eric Schulman
Daniel Coughlin	Shane Hunter	Leslie Serunian
Sean M. Coughlin	David E. Johnson	Gregory J. Sieczkiewicz
David F. Crosby	Jennifer Karnakis	Eric Sinn
Caryn DeHoratius	Cynthia Kozakiewicz	Timur Slonim
Ivor R. Elrifi	Richard M. Lehrer	Christina K. Stock
Heidi A. Erlacher	Alison McCarthy	Nicholas P. Triano III
Flora Feng	Christopher Millikin	
Eugene Feher	A. Jason Mirabito	

of

MINTZ, LEVIN, COHN, FERRIS, GLOVSKY and POPEO, P.C.
One Financial Center, Boston, Massachusetts 02111, United States of America
701 Pennsylvania Avenue, N.W., Washington, D.C. 20004, United States of America
One Fountain Square, 11911 Freedom Drive, Reston, Virginia 20190, United States of America
Chrysler Center, 666 Third Avenue, New York, New York 10017, United States of America

to represent the undersigned before all competent International Authorities in connection with the international application identified below:

Title of the invention: **APTAMERS TO THE HUMAN IL-12 CYTOKINE FAMILY AND THEIR USE AS AUTOIMMUNE DISEASE THERAPEUTICS**

International application number: **PCT/US2005/007666**

filed with the United States Patent and Trademark Office as receiving Office and to make or receive payments on behalf of the undersigned.

KRISTIN THOMPSON

Date: 11/18/05

TRA 2033606v1

PATENT COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF RECEIPT OF RECORD COPY

(PCT Rule 24.2(a))

To:

ELRIFI, Ivor, R.
Mintz, Levin, Cohn, Ferris,
Glovsky and Popeo PC
One Financial Center
Boston, MA 02111
United States of America

Date of mailing (day/month/year)	IMPORTANT NOTIFICATION
03 June 2005 (03.06.2005)	
Applicant's or agent's file reference	**International application No.**
23239-578-061 (A)	PCT/US2005/007666

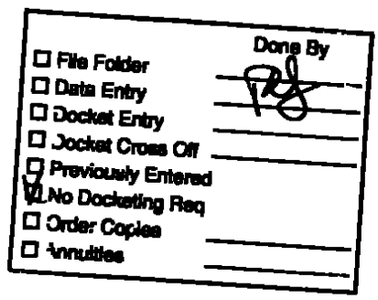
The applicant is hereby notified that the International Bureau has received the record copy of the international application as detailed below.

Name(s) of the applicant(s) and State(s) for which they are applicants:

ARCHEMIX CORP (for all designated States except US)
CLOAD, Sharon, T. et al (for US)

International filing date	:	07 March 2005 (07.03.2005)
Priority date(s) claimed	:	05 March 2004 (05.03.2004) 07 September 2004 (07.09.2004)
Date of receipt of the record copy by the International Bureau	:	04 May 2005 (04.05.2005)
List of designated Offices	:	

AP :BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW
EA :AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM
EP :AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,MC,NL,PL,PT,RO,SE,SI,SK,TR
OA :BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG
National :AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NA,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW





The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer: Sabine Przymusinski
Facsimile No. (41-22) 338.87.40	Telephone No. (41-22) 338 9484

320

Continuation of Form PCT/IB/301

NOTIFICATION OF RECEIPT OF RECORD COPY

Date of mailing (day/month/year)	IMPORTANT NOTIFICATION
03 June 2005 (03.06.2005)	
Applicant's or agent's file reference	**International application No.**
23239-578-061	PCT/US2005/007666

ATTENTION

The applicant should carefully check the data appearing in this Notification. In case of any discrepancy between these data and the indications in the international application, the applicant should immediately inform the International Bureau.

In addition, the applicant's attention is drawn to the information contained in the Annex, relating to:

- time limits for entry into the national phase - see updated important information (as of April 2002)
- requirements regarding priority documents (if applicable)

A copy of this Notification is being sent to the receiving Office and to the International Searching Authority.

301

ANNEX TO FORM PCT/IB/301

International application No.
PCT/US2005/007666

INFORMATION ON TIME LIMITS FOR ENTERING THE NATIONAL PHASE

The applicant is reminded that the "national phase" must be entered before each of the designated Offices indicated on the cover sheet of this Notification by paying national fees and furnishing translations, as prescribed by Articles 22 and 39 and the applicable national laws. In addition, the applicant may also have to comply with other special requirements applicable in certain Offices. It is the applicant's responsibility to ensure the necessary steps to enter the national phase are taken in a timely fashion. Most Offices do not issue reminders to applicants in connection with the entry into the national phase.

The applicable time limit for entering the national phase will, subject to what is said in the following paragraph, be 30 MONTHS from the priority date, not only in respect of any elected Office if a demand for international preliminary examination is filed before the expiration of 19 months from the priority date (see Article 39(1)), but also in respect of any designated Office, in the absence of filing of such demand, where Article22(1) as modified with effect from 1 April 2002 applies in respect of that designated Office. For further details, see PCT Gazette No. 44/2001 of 1 November 2001, pages 19926, 19932 and 19934, as well as the PCT Newsletter, October and November 2001 and February 2002 issues.

In practice, time limits other than the 30-month time limit will continue to apply, for various periods of time, in respect of certain designated or elected Offices. For regular updates on the applicable time limits (20, 21, 30 or 31 months, or other time limit), Office by Office, refer to the PCT Gazette("Section IV" part published on a weekly basis), to the PCT Newsletter (on a monthly basis) and to the relevant National Chapters in Volume II of the PCT Applicant's Guide (the paper version of which is updated usually twice a year and the Internet version of which is updated usually on a weekly basis). Finally, a cumulative table of all applicable time limits for entering the national phase is available from WIPO's Internet site, via links from various pages the site including those of the Gazette, Newsletter and Guide, at http://www.wipo.int/pct/en/index.html.

Information about the requirements for filing a demand for international preliminary examination is set out in the PCT Applicant's Guide, Volume I/A, Chapter IX. Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination (at present, all PCT Contracting States are bound by Chapter II).

REQUIREMENTS REGARDING PRIORITY DOCUMENTS

For applicants who have not yet complied with the requirements regarding priority documents, the following is recalled.

Where the priority of an earlier national, regional or international application is claimed, the applicant must submit a copy of the said earlier application, certified by the authority with which it was filed ("the priority document") to the receiving Office (which will transmit it to the International Bureau) or directly to the International Bureau, before the expiration of 16 months from the priority date, provided that any such priority document may still be submitted to the International Bureau before that date of international publication of the international application, in which case that document will be considered to have been received by the International Bureau on the last day of the 16-month time limit (Rule 17.1(a)).

Where the priority document is issued by the receiving Office, the applicant may, instead of submitting the priority document, request the receiving Office to prepare and transmit the priority document to the International Bureau. Such request must be made before the expiration of the 16-month time limit and may be subjected by the receiving Office to the payment of a fee (Rule 17.1(b)).

If the priority document concerned is not submitted to the International Bureau or if the request to the receiving Office to prepare and transmit the priority document has not been made (and the corresponding fee, if any, paid) within the applicable time limit indicated under the preceding paragraphs, any designated State may disregard the priority claim, provided that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within the time limit which is reasonable under the circumstances (Rule 17.1(c)).

Where several priorities are claimed, the priority date to be considered for the purposes of computing the 16-month time limit (and all other PCT time limits) is the filing date of the earliest application whose priority is claimed (Article 2(xi)(b)).

JV

PATENT COOPERATION TREAT

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION CONCERNING SUBMISSION OR TRANSMITTAL OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

To:

ELRIFI, Ivor, R.
Mintz, Levin, Cohn, Ferris, Glovsky and Popeo PC
One Financial Center
Boston, MA 02111
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Date of mailing *(day/month/year)* 20 June 2005 (20.06.2005)	
Applicant's or agent's file reference 23239-578-061 A	**IMPORTANT NOTIFICATION**
International application No. PCT/US05/007666	International filing date *(day/month/year)* 07 March 2005 (07.03.2005)
International publication date *(day/month/year)*	Priority date *(day/month/year)* 05 March 2004 (05.03.2004)
Applicant ARCHEMIX CORP et al	

1. By means of this Form, which replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents, the applicant is hereby notified of the date of receipt by the International Bureau of the priority document(s) relating to all earlier application(s) whose priority is claimed. Unless otherwise indicated by the letters "NR", in the right-hand column or by an asterisk appearing next to a date of receipt, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).

2. *(If applicable)* The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which, on the date of mailing of this Form, had not yet been received by the International Bureau under Rule 17.1(a) or (b). Where, under Rule 17.1(a), the priority document must be submitted by the applicant to the receiving Office or the International Bureau, but the applicant fails to submit the priority document within the applicable time limit under that Rule, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

3. *(If applicable)* An asterisk (*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b) (the priority document was received after the time limit prescribed in Rule 17.1(a) or the request to prepare and transmit the priority document was submitted to the receiving Office after the applicable time limit under Rule 17.1(b)). Even though the priority document was not furnished in compliance with Rule 17.1(a) or (b), the International Bureau will nevertheless transmit a copy of the document to the designated Offices, for their consideration. In case such a copy is not accepted by the designated Office as the priority document, Rule 17.1(c) provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

Priority date	Priority application No.	Country or regional Office or PCT receiving Office	Date of receipt of priority document
05 March 2004 (05.03.2004)	60/550,962	US	06 May 2005 (06.05.2005)
07 September 2004 (07.09.2004)	60/608,046	US	09 May 2005 (09.05.2005)

Done By DM
- ☑ Data Entry
- ☐ Docket Entry
- ☑ Docket Cross Off
- ☐ Previously Entered
- ☐ No Docketing Req.
- ☐ ELITE
- ☐ Annuities

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. +41 22 740 14 35

Authorized officer
Birchen Mireille

Facsimile No. +41 22 338 87 40
Telephone No. +41 22 338 8345

RECEIVED
JUL 0 1 2005
MINTZ LEVIN, BOSTO.
PATENT DOCKET DEP

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

FIRST NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF THE COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL APPLICATION (TO DESIGNATED OFFICES WHICH DO NOT APPLY THE 30 MONTH TIME LIMIT UNDER ARTICLE 22(1))

(PCT Rule 47.1(c))

To:

ELRIFI, Ivor, R.
Mintz, Levin, Cohn, Ferris, Glovsky and Popeo PC
One Financial Center
Boston, MA 02111
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Date of mailing *(day/month/year)* 06 October 2005 (06.10.2005)	
Applicant's or agent's file reference 23239-578-061 A	**IMPORTANT NOTICE**
International application No. PCT/US2005/007666	International filing date *(day/month/year)* 07 March 2005 (07.03.2005)
Priority date *(day/month/year)* 05 March 2004 (05.03.2004)	
Applicant ARCHEMIX CORP. et al	

1. **ATTENTION:** For any designated Office(s), for which the time limit under Article 22(1), as in force from 1 April 2002 (30 months from the priority date), **does apply**, please see Form PCT/IB/308(Second and Supplementary Notice) (to be issued promptly after the expiration of 28 months from the priority date).

2. Notice is hereby given that the following designated Office(s), for which the time limit under Article 22(1), as in force from 1 April 2002, **does not apply**, has/have requested that the communication of the international application, as provided for in Article 20, be effected under Rule 93*bis*.1. The International Bureau has effected that communication on the date indicated below:
22 September 2005 (22.09.2005)

   CH

   In accordance with Rule 47.1(c-*bis*)(i), those Offices will accept the present notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

3. The following designated Offices, for which the time limit under Article 22(1), as in force from 1 April 2002, **does not apply**, have not requested, as at the time of mailing of the present notice, that the communication of the international application be effected under Rule 93*bis*.1 :

   LU, SE, TZ, UG, ZM

   In accordance with Rule 47.1(c-*bis*)(ii), those Offices accept the present notice as conclusive evidence that the Contracting State for which that Office acts as a designated Office does not require the furnishing, under Article 22, by the applicant of a copy of the international application.

4. **TIME LIMITS for entry into the national phase**

   For the designated Office(s) listed above, and unless a demand for international preliminary examination has been filed before the expiration of **19 months** from the priority date (see Article 39(1)), the applicable time limit for entering the national phase will, subject to what is said in the following paragraph, be **20 MONTHS** from the priority date.

   In practice, time limits other than the 20-month time limit will continue to apply, for various periods of time, in respect of certain of the designated Offices listed above. For regular updates on the applicable time limits (20 or 21 months, or other time limit), Office by Office, refer to the *PCT Gazette*, the *PCT Newsletter* and the *PCT Applicant's Guide*, Volume II, National Chapters, all available from WIPO's Internet site, at http://www.wipo.int/pct/en/index.html.

   It is the applicant's sole responsibility to monitor all these time limits.

Done By
☑ Data Entry PM
☐ Docket Entry
☐ Docket Cross Off
☐ Previously Entered
☐ No Docketing Req.
☐ Other

RECEIVED
OCT 14 2005
MINTZ LEVIN, BOSTO.
PATENT DOCKET DEP

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No.+41 22 740 14 35

Authorized officer
Dorothée Mülhausen

Facsimile No.+41 22 338 87 40

324

APTÁMEROS PARA LA FAMILIA CITOQUINA IL-12 HUMANA Y SU USO COMO TERAPÉUTICOS PARA ENFERMEDADES AUTOINMUNES

CAMPO DE LA INVENCIÓN

[0001] La invención se relaciona de manera general con el campo de los ácidos nucleicos más particularmente con los aptámeros capaces de unirse a los miembros de la familia citoquina interleuquina -12 (IL-12) humana, más específicamente con la interleuquina -12 (IL-12) humana, interleuquina -23 humana (IL-23), o tanto la IL-12 como la IL-23, y otras citoquinas relacionadas (por ejemplo la IL-27 y el dímero p40). Tales aptámeros son útiles como terapéuticos en y diagnósticos de enfermedades relacionadas autoinmunes y/o otras enfermedades o desordenes en las cuales las citoquinas de la familia IL-12, específicamente IL-23 y L-12, también están implicadas. La invención se relaciona además con materiales y métodos para la administración de aptámeros capaces de unirse a IL-23 y/o IL-12.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

[0002]. Loa aptámeros son moléculas de ácido nucleico que tienen afinidad de unión específicas con las moléculas a través de interacciones diferentes a los pares base de Watson - Crack clásicos.

[0003] Los aptámeros como péptidos generados por despliegue de fago o al cuerpo monoclonal ("mAbs"), son capaces de unir específicamente a blancos seleccionados y modular la actividad de los blancos, por ejemplo, a través de la unión de aptámeros pueden bloquear su capacidad de blanco para funcionar. Creados por un proceso de selección *in vitro* de grupos de oligonucleótidos de secuencia aleatoria, Los aptámeros se han generado para más 100 proteínas que incluyen factores de crecimiento, factores de trascripción, enzimas, inmunoglobulinas, y receptores. Un aptámeros típico es de 10-15 kDa de tamaño (3-45 nucleótidos), reúne a su blanco con actividad nanomolar, y discrimina contra blancos cercanamente relacionados (por ejemplo, los aptámeros típicamente no se unirán a otras proteínas de la misma familia de genes). Una serie de estudios estructurales ha mostrado que los aptámeros son capaces de utilizar los mismos tipos de interacción (por ejemplo unión de hidrógeno, complementariedades electrostáticas, contactos hidrófobos, exclusión estérica) que maneja la afinidad y la especificidad en los complejos anticuerpo-antígeno.

[0004] Los aptámeros tienen un número de características deseables para uso como terapéuticos y diagnósticos e incluyen alta especificidad y afinidad, eficacia biológica, y propiedades farmacinéticas excelentes. Además, ellos ofrecen ventajas competitivas específicas sobre los anticuerpos y otros biológicos de proteína, por ejemplo:

[0005] 1) velocidad y control. Loa aptámeros son producidos por un proceso completamente *in vitro* que permite la rápida generación de conductores iniciales, incluyendo conductores terapéuticos. La selección in vitro permite la especificidad y la afinidad del aptámero para ser estrechamente controlada y permite la generación de conductotes, que incluyen conductores contra blancos tóxicos y no inmunogénicos.

[0006] 2) Toxicidad e Inmunogenicidad. Los aptámeros como una clase han demostrado poca o ninguna toxicidad o inmunogenicidad. En la dosificación crónica de ratas o marmotas canadienses con altos niveles de aptámero (10 mg/kg diario durante 90 días), sin toxicidad se observa mediante cualquier medición clínica, celular o bioquímica. Mientras que la eficacia de muchos anticuerpos monoclonales se puede limitar severamente por la respuesta inmune a los anticuerpos mismos, es extremadamente difícil elicitar anticuerpos a los aptámeros más probablemente por que los aptámeros no pueden ser presentados por células t por vía del MHC y la respuesta inmune es generalmente ensayada para no reconocer los fragmentos de ácido nucleico.

[0007] 3) Administración. Mientras la mayoría de los terapéuticos de los anticuerpos habitualmente aprobados son administrados por infusión intravenosa (típicamente durante

2-4 horas), los aptámeros se pueden administrar mediante inyección subcutánea (biodisponibilidad del aptámero por vía de administración subcutánea es > 80% en estudios con monos (Tucker et al., J. Chromatography B. 732: 203-212, 1999))). Esta diferencia es principalmente debido a solubilidad comparativamente baja y así en grandes volúmenes necesarios para la mayoría de los terapéuticos mAbs. Con buena solubilidad (> 150 mg/mL) y comparativamente bajo peso molecular (aptámero: 10 -50 kDa; anticuerpo: 150 kDa), una dosis de aptámero semanal se puede suministrar mediante inyección en un volumen de menos de 0.5 mL. Además, el tamaño pequeño de los aptámeros les permite penetrar en áreas de restricciones conformacionales que no se le permite a los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos penetrar, presentando aún otra ventaja para los terapéuticos o la profilaxis basada en aptámero.

[0008] 4) Escalabilidad y Costo. Los aptámeros terapéuticos son químicamente sintetizados y consecuentemente pueden fácilmente ser escalados según se necesite para cumplir con la demanda de producción. Mientras las dificultades en la producción a escala son habitualmente limitantes la disponibilidad de algunos biológicos y el costo de capital de la planta de producción de proteína a gran escala es enorme, un sintetizador de oligonucleótido simple a gran escala puede producir asensos de 100 kg/año y requiere una inversión inicial relativamente modesta. El costo

habitual de bienes para las síntesis de aptámero a escala de kilogramo se estima en 500/g comparable con aquel de los anticuerpos altamente optimizados. Continuando las mejoras en el proceso de desarrollo se espera disminuir los costos de bienes aa < $100/g en cinco años.

[0009] 5) Estabilidad. Los aptámeros terapéuticos son químicamente robustos. Ellos están adaptados intrínsecamente a reganar actividad luego de la exposición a factores tales como calor y desnaturalizantes y se pueden almacenar durante periodos extendidos (> 1 año) a temperatura ambiente como polvos liofilizados.

CITOQUINAS Y RSPUESTA INMUNE.

[0010] La respuesta inmune en mamíferos está basada en una serie de interacciones celulares complejas denominadas la "red inmune". Además de las interacciones celulares similares a red de los linfocitos, macrófagos, granulocitos, y otras células, las proteínas solubles conocidas como linfoquinas, citoquinas, y monoquinas juegan un papel crítico para controlar estas interacciones celulares. La expresión de citoquinas por las células del sistema inmune juega un papel importante en la regulación de la respuesta inmune. La mayoría de las citoquinas son pleiotrópicas y tienen múltiples actividades biológicas que incluyen la presentación de antígeno; la activación, proliferación, y diferenciación

de los subconjuntos de células CD4+; las respuestas de anticuerpos por las células; y la manifestación de hipersensibilidad. Las citoquinas están implicadas en un amplio rango de condiciones degenerativas o anormales que involucran directa o indirectamente el sistema inmune y/o las células hematopoieticas. Una familia importante de citoquinas es la familia IL-12 que incluye, por ejemplo, IL-12, IL-23, IL-27, y los monómeros p40 y dímeros p40.

[0011] La IL-23 es una molécula heterodimérica covalentemente ligada compuesta de las subunidades p19 y p40. Cada una codificada por genes separados. La IL-12 también es una molécula heterodimérica covalentemente ligada y consiste de las subunidades p35 y p40. Así, la IL-23 y la IL-12 tienen ambas la subunidades p40 en común (Figura 1). El p19 de humano y ratón comparte seguro o aproximado 70% de identidad de la secuencia de aminoácido y están cercanamente relacionados con el p35 (la única subunidad para el IL-12). Los ensayos de transfección revelan que como el p35, la proteína p19 es pobremente secretada cuando se expresa sola y requiere la coexpresión de su compañero heterodimerizante p40 para mayor expresión. Juntos, el p40 y p19 forman un heterodímero ligado a disulfuro. El componente p19 se produce en grandes cantidades por los macrófagos activados, las células dendríticas ("DCs"), las células endoteliales, y las células T. Las células Th1 expresan mayores cantidades de p19 mARN que las células Th2; sin embargo, entre estos tipos de

células solamente los macrófagos activados y los DC expresan constitutivamente el p40, los otros componentes del IL-23. La expresión del p19 se incrementa por los productos bacterianos receptor-2 similar a Toll que sugiere que el p19, y así el IL-23, puedan funcionar en la respuesta inmune para ciertas infecciones bacterianas.

[0012] Una de las acciones compartidas del IL-12 y IL-23 es su efecto proliferativo sobre las células T (Brombacher *et al.*, Trends in immun. (2003)). Sin embargo, existen claras diferencias en los subconjuntos de células T sobre los cuales estas citoquinas actúan. En el ratón, el IL-12 induce la proliferación de células T de murino naive pero no células T con memoria, mientras que el efecto proliferativo del IL-23 se confina a las células T con memoria. En los humanos, el IL-12 promueve la proliferación tanto de células T humanas naive como con memoria; sin embargo, el efecto proliferativo del IL-23 está aún restringido de las células T con memoria. También, la acción del IL-23 sobre la producción de IFN-γ está dirigida principalmente hacia las células T con memoria en los humanos. Aunque el IL-12 puede inducir producción de IFN-γ en células T naive y, aún en un< mayor proporción, células T con memoria, el IL-23 tiene muy poco efecto sobre la producción de IFN-γ en células T naive. Un incremento moderado de la producción de IFN-γ se observa en las células T con memoria estimuladas por el IL-23, pero este efecto es

un poco más pequeño que aquel resultante de la estimulación con el IL-12.

[0013] Así, el IL-23 tiene un actividad biológica que es distinta del IL-12, sin embargo se cree que ambos juegan un papel en las enfermedades autoinmunes e inflamatorias tales como esclerosis múltiple, artritis reumatoide, soriasis, lupus heritematosus sistémico, y enfermedades irritables del intestino (que incluye la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerativa), además de las enfermedades tales como la reabsorción de hueso en la osteoporosis, la diabetes tipo I, y el cáncer.

APTÁMEROS ESPECÍFICOS IL-23 Y/O IL-12 COMO TERAPÉUTICOS PARA ENFERMEDAD AUTOINMUNE

[0014] Aunque no se pretende estar ligado por la teoría, se cree que el IL-12 y el IL-23 están involucrados en la patogénesis de la esclerosis múltiple ("MS"). Por ejemplo, los niveles p40 están sobre regulados en los fluidos espirales cerebrales de los pacientes MS (Fassbender *et al.*,(1998) Neurology: 51: 753). Además, un anti-p40 mAb ha sido mostrado por localizarse en lesiones en el cerebro (Brok et al., JI (2002) 169: 6554). Adicionalmente, los niveles de línea base inferiores del p40 mARN han mostrado que predicen la respuesta clínica al tratamiento IFN-β (Van-Boxel-Dezaire et al., 1999). Así, un "knock-down" de Ambos el IL-12 Y El

IL-23 por vía del p40 podría mejorar los síntomas de la MS. De hecho, los anticuerpos anti-p-40 han mostrados que suprime significativamente el desarrollo de la severidad de la Encefalomielitis Autoinmune Erxperimental ("EAE") en ratones (Constantinescu *et al.*, JI (1998) 161: 5097)y en monos titi (BROS et al., JI (2002) 169: 6554).

[0015] A pesar de la evidencia que muestra que el "knocking out" de ambos IL-23 y IL-12 suprime el desarrollo de los síntomas de MS, existe fuerte evidencia de que el IL-23 es el más importante de los dos en la patogénesis MS/EAE en ratones, como se muestra por los efectos del "knocking out" y IL-12 y IL-23 sobre el modelo de ratón EAE. (Cua et al., (2002) Nature 421: 744). Por ejemplo, el EAE puede ocurrir en los ratones knock-out p35, pero no en los ratones "knocking out" p19 o p40 (Cua et al., (2003)). La expresión del IL-23 pero no el IL-12 en el CNS rescata el EAE en los ratones "knocking out" p19/p40, aunque la sobre expresión del IL-12 exacerba el EAE, así el IL-12 parece jugar algún papel en el desarrollo de la activación de la célula TH1 general (Cua *et al.*). En los humanos, la sobre expresión del mARN p40 pero no el mARN p35 ha sido observada en el Sistema Nervioso Central (SNC) de los pacientes MS.

[0016] Además de jugar un papel general para activas las células TH1, IL-12 puede ser más importante para luchar con la infección que el IL-23. En los ratones, un knock-out p19

induce la respuesta de la célula TH1 clásica (IFN-γ alta, IL-4 baja), mientras que la respuesta en los ratones knock-out P35 Y P40 está restringida a las células TH2. (IFN-γ BAJA, IL-4 alta) (Referencia). Adicionalmente, las células inmunes knock-out p19 producen citoquinas pro-inflamatorias fuertes, mientras que las células inmunes knock-out p40 no. Finalmente, los ratones knock-out p40, IL-12Rβ1 y IL-12Rβ2 son susceptibles a una variedad de infecciones (Adorini, de la Contemporary Immunology (2003) pg, 253). Así exhibiendo específicamente IL-23 a través de los terapéuticos de aptámero se puede luchar efectivamente con la enfermedad mediada por IL-23 mientras que deja el paciente más capaz de luchar con infección.

[0017] Tanto el IL-23 como el IL-12 han estado implicados en artritis reumatoide como un promotor de la inflamación de la articulación en la etapa final. Aunque no se pretende estar ligado por la teoría, se cree que el IL-23 afecta la función de las células T de memoria y los macrófagos inflamatorios a través del acoplamiento del recepto IL-23 (IL-23R) sobre estas células. Los estudios indican que las subunidades de IL-23 p19 y/o p40 juegan un papel en la artritis inducida por colágeno y murino "CIA", el modelo de ratón de artritis reumatoide. Los anticuerpos anti-p40 se ha mostrado que mejoran los síntomas en CIA de murino y evitan el desarrollo de la progresión sola y cuando se combinan con el tratamiento de factor de necrosis anti tumoral (anti-TNF)

(Malfail et al., Clin. Exp. Immunol. (1998) 111: 377, Matiz et al., Eur. J. Immunol. (1998)28: 2143, y Butler et al, Eur. J. Immunol. (1999)29: 2205). Adicionalmente, los ratones knock-out p19 Y p40 han mostrado que resisten completamente el desarrollo del CIA y la severidad se exacerba en los ratones knock-out p35 (McIntyre et al., Eur. J. Immunol. (1996) 26: 2933, Y Murphy et al., J. Exp. Med. (2003) 198: 1951. Así, los aptámeros y los métodos de la presente invención que se unen e inhiben el IL-23 son útiles como agentes terapéuticos para la artritis reumatoide.

[0018] Tanto el IL-23 como el IL-12 se cree que juegan un papel dominante en el reclutamiento de células inflamatorias en enfermedades mediadas por Th-1 tal como la psoriasis vulgaris, ý la enfermedad del intestino irritable, que incluyen pero no están limitadas a la enfermedad de Crohn y a la colitis ulcerativa. Por ejemplo, los niveles elevados de p19 y p40 mARN fueron detectados en RT-PCR cuantitativo en lesiones de piel de pacientes con psoriais vulgaris, mientras que el p35 mARN no (Lee et al, J. Exp Med (2004) 199(1): 125-30). En colitis por ácido 2, 4, 6, trinitrobenzeno sulfónico ("TNBS"), un modelo experimental de enfermedad de intestino inflamatorio en ratones, el tratamiento con anticuerpo monoclonal anti-IL-12 suministró eficacia en mejorar completamente/prevenir la inflamación de la mucosa (Neuralth et al., J Exp Med (1995) 182: 1281-1290). En otro estudio que evaluó varias diferentes antagonistas IL-12 en el modelo de

colitis TNBS, el anticuerpo anti-IL-12 p40 probó ser más efectivo para permitir la inflamación de la mucosa, implicando así tanto el IL-12 como el IL-23 (Schmidt et al., Pathobiology (2002-03); 70: 177-183). Así, los aptámeros de la presente invención que se unen a e inhiben el LI-12 y/o LI-23 son útiles como agentes terapéuticos para la psoriasis y las enfermedades inflamatorias del intestini.

[0019] También se cree que el IL-12 y/o IL-23 juegan un papel en el lupus eritematosus sistémico con ("SLE"). Por ejemplo, el suero obtenido de pacientes SLE se enconito que contenía cantidades significativamente altas de p40 como un monómero que los niveles del suero del p40 como un heterodímero, por ejemplo IL-12 (p35/p40) e IL-23 (p19/p40), indicando que la producción deficiente en IL-23 y/o LI-12 puede jugar un papel en la patogénesis del SLE. Así, los aptámeros de la invención que mejoran la función biológica del IL-23 y/o IL-12 son útiles como terapéuticos en el tratamiento del lupus eritematosus sistémico(Lauwerys et al., Lupus (2002) 11(6): 38-7).

APTÁMEROS ESPECÍFICOS IL-23 Y/O YL-12 COMO TERAPÉUTICOS ONCOLÓGICOS.

[0020] La actividad antitumoral del IL-12 ha sido bien caracterizada, y recientes estudios han mostrado que el IL-23 también posee actividad antitumoral y anti-metastática.

Por ejemplo, las células de carcinoma de colon retroviralmente translucidas con IL-23 reduce significativamente el crecimiento de los tumores de colon establecidos por las línea de célula en ratones inmunocompenentes comparado con la línea de célula de control, indicando que la expresión de los IL-23 en los tumores produce un efecto antitumoral. (Wang et al., Int. J. Cáncer: 105. 820-824 (2003). De manera similar, la línea de célula de carcinoma de pulmón trabajada por ingeniería retroviralmente para liberar la cadena simple IL-23 ("scIL-23") suprime significativamente la metástasis en pulmón en los ratones BALB/c, dando como resultado un rechazo del tumor casi completo (Lo et al., J. Immunol 2003, 171: 600-607). Así, los aptámeros que se unen al IL-23 y/o IL-12 y mejoran su función biológica son útiles como terapéuticos oncológicos para el tratamiento de cáncer de colon, el cáncer de pulmón, específicamente la metástasis de pulmón, y otras enfermedades oncológicas para lo cual IL-23 y/o IL-12 tienen un efecto antitumoral.

[0021] Existe habitualmente un agente terapéutico no conocido que apunta específicamente al IL-23 humano. Los agentes disponibles que apuntan a IL-23 incluyen un anticuerpo policlonal IL-23 p19 anti humano disponible a través de R&D Systems (Minneapolis, MN) solamente para uso en investigación, un anticuerpo monoclonal p40 anti humano que apunta tanto al IL-12 como el IL-23 en razón a que ambas

citoquinas tienen la subunidad p40 en común, y los anticuerpos policlonales y monoclonales IL-23 p19 anti ratón, que apuntan al IL-23 de ratón, y no al IL-23 de humano (Pirhone, etal., 820029, J Immunology 169: 5673-5678). Como se explicó previamente, un agente que inhibe la actividad tanto del IL-23 como del IL-12 puede dejar los pacientes más vulnerables a las infecciones, y e general puede poseer más complicaciones en términos de desarrollar un agente terapéutico que un agente que inhibe solamente el IL-23. En razón a que hay evidencia de que el IL-23 juega un papel más importante que el IL-12 para la inflamación autoinmune en el cerebro y las articulaciones, un terapéutico específico para solamente el IL-23 puede ser más ventajoso que un agente que apunte a ambas citoquinas tal como el mAB humano anti-p40.

[0022] Dadas las ventajas de de la especificidad, el tamaño pequeño, y la afinidad de los aptámeros como agentes terapéuticos, sería benéfico tener materiales y métodos para terapéuticos para tratar enfermedades en las cuales las citoquinas humanas específicamente la IL-23 y la IL-12 juegan un papel en la patogénesis. La presente invención suministra materiales y métodos que cumplen estas y otras necesidades.

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

[0023] La presente invención suministra materiales y métodos para el tratamiento de enfermedad autoinmune e

inflamatoria y otras enfermedades/desordenes relacionados en los cuales el IL-23 y/o IL-12 están involucrados en la patogénesis.

[0024] En una modalidad, los materiales de la presente invención suministran aptámeros que se unen específicamente al IL-23. En una modalidad, el IL-23 al cual los aptámeros de la invención se unen es el IL-23 mientras que n otra modalidad el IL-23 es una variante del IL-23 humano. En una modalidad la variante del IL-23 desarrolla una función biológica que es esencialmente la misma que la función del IL-23 humano y tiene sustancialmente la misma estructura y sustancialmente la misma capacidad de unirse a dicho aptámero que aquel del IL-23 humano.

[0025] En una modalidad, el IL-23 humano o una variante de este, comprende una secuencia de aminoácido la cual es al menos 70% idéntica, preferiblemente al menos al menos 80% idéntico, más preferiblemente al menos 90% idéntica con una secuencia que comprende la SEQ ID NO: 4 Y/O 5. En otra modalidad, el IL-23 humano o una variante de este tiene una secuencia de aminoácido que comprende la SEQ ID NO: 4 y 5.

[0026] En una modalidad, el aptámero de la invención tiene una constante de disociación para el IL-23 humano o una variante de esta de aproximadamente 100 nM o menos,

preferiblemente 50 nM o menos, más preferiblemente 10 nM o menos, aún más preferiblemente un nM o menos.

[0027] En una modalidad, el aptámero de la presente invención modula una función del IL-23 humano o una variante de esta. En una modalidad, el aptámero de la presente invención estimula una función del IL-23 HUMANO. En otra modalidad, el aptámero de la presente invención inhibe una función del IL-23 humano o una variante de esta. En aún otra modalidad, el aptámero de la presente invención inhibe una función del IL-23 humano o una variante de esta e *in vivo*. En aún otra modalidad, el aptámero de la presente invención evita que el IL-23 se una al receptor IL-23.En algunas modalidades, la función del IL-23 humano o una variante de esta que se modula por el aptámero de la invención es mediar una enfermedad asociada con el IL-23 humano tal como: la enfermedad autoinmune (que incluye pero no está limitada a la esclerosis múltiple, artritis reumatoide, psoriasis, lupus eritematosos sistémico, y enfermedad irritable del intestino (por ejemplo, Enfermedad de Crohn y colitis ulcerativa), enfermedad inflamatoria, cáncer (que incluye pero no esta limitado a cáncer de colon, cáncer de pulmón, y metástasis en pulmón), la absorción de hueso en osteoporosis, y diabetes tipo I.

[0028] En una modalidad, el aptámero de la invención tiene sustancialmente la misma capacidad de unirse al IL-23 humano

como aquella de un aptámero que comprende una secuencia de nucleótido seleccionada del grupo que consiste de la SEQ ID NOS 13-66, SEQ ID NOS 71-88, SEQ ID NOS 91-96, SEQ ID NOS 103-118, SEQ ID NOS 124-130, SEQ ID NOS 135-159, SEQ ID NO 162, y SEQ ID NOS 164-172, SEQ ID NOS 176-178, SEQ ID NOS 181-196, Y SEQ ID NOS 203-314. En otra modalidad el aptámero de la invención tiene sustancialmente la misma estructura y sustancialmente la misma capacidad de unirse al IL-23 como aquella de un aptámero que comprende una secuencia de nucleótido seleccionada del grupo que consiste de: SEQ ID NOS 13-66, SEQ ID NOS 71-88, SEQ ID NOS 91-96, SEQ ID NOS 103-118, SEQ ID NOS 124-130, SEQ ID NOS 135-159, SEQ ID NO 162, y SEQ ID NOS 164-172, SEQ ID NOS 176-178, SEQ ID NOS 181-196, y SEQ ID NOS 203-314.

[0029] En una modalidad, la presente invención suministra un aptámero que se une al IL-23 humano que comprende una secuencia de ácido nucleico al menos 80% idéntica, más preferiblemente al menos 90% idéntica con una cualquiera de las secuencias seleccionadas del grupo que consiste de la SEQ ID NOS 13-66, SEQ ID NOS 71-88, SEQ ID NOS 91-96, SEQ ID NOS 103-118, SEQ ID NOS 124-130, SEQ ID NOS 135-159, SEQ ID NO 162, y SEQ ID NOS 164-172, SEQ ID NOS 176-178, SEQ ID NOS 181-196, y SEQ ID NOS 203-314. En otra modalidad, la presente invención suministra un aptámero que comprende 4 nucleótidos contiguos, preferiblemente 8 nucleótidos contiguos, más preferiblemente 20 nucleótidos contiguos, que son idénticos a

una secuencia de 4, 8 o 20 nucleótidos contiguos en la región de secuencia única de cualquiera de las secuencias seleccionadas del grupo de: SEQ ID NO 13-66, SEQ ID NOS 71-88, SEQ ID NOS 91-96, SEQ ID NOS 103-118, SEQ ID NOS 124-130, SEQ ID NOS 135-159, SEQ ID NO 162, y SEQ ID NOS 164-172, SEQ ID NOS 176-178, SEQ ID NOS 181-196, y SEQ ID NOS 203-314. En aún otra modalidad de la presente invención suministra un aptámero capaz de unirse al IL-23 humano o una variante de esta que comprende una secuencias de nucleótido seleccionada del grupo que consiste de: SEQ ID NOS 13-66, SEQ ID NOS 71-88, SEQ ID NOS 91-96, SEQ ID NOS 103-118, SEQ ID NOS 124-130, SEQ ID NOS 135-159, SEQ ID NO 162, y SEQ ID NOS 164-172, SEQ ID NOS 176-178, SEQ ID NOS 181-196, y SEQ ID NOS 203-314. En otra modalidad, la presente invención suministra un aptámero que tiene la secuencia establecida en la SEQ ID NO 177, preferiblemente la SEQ ID NO 224, más preferiblemente la SEQ ID NO 309, más preferiblemente la SEQ ID NO 310, y más preferiblemente la SEQ ID NO 311.

[0030] En una modalidad, la presente invención suministra aptámeros que se unen específicamente al IL-23 de ratón. En otra modalidad, la presente invención suministra aptámeros que se unen a una variante de IL-23 de ratón que desarrolla una función biológica que es esencialmente la misma que la función del IL-23 de ratón y que tiene sustancialmente la misma estructura y sustancialmente la misma capacidad de unirse a dicho aptámero como aquella del IL-23 de ratón.

[0031] En una modalidad, el IL-23 de ratón o una variante de éste al cual el aptámero de la invención se une comprende una secuencia de aminoácido que es al menos 80%, preferiblemente al menos 90% idéntica con una secuencia que comprende la SEQ ID NOS 315 y/o 316. En otra modalidad el IL-23 de ratón o una variante de esta tiene una secuencia de aminoácido que comprende las SEQ ID NOS 315 y 316.

[0032] En una modalidad, el aptámero de la invención tiene una constante de disociación para el IL-23 de ratón o una variante de este de aproximadamente 100 nM o menos, preferiblemente 50 nM o menos, más preferiblemente 10 nM o menos.

[0033] En una modalidad, el aptámero de la invención modula una función del IL-23 de ratón o una variante de ésta. En una modalidad, el aptámero de la invención estimula una función del IL-23 de ratón. En otra modalidad, el aptámero de la invención inhibe una función del IL-23 de ratón o una variante de este. En aún otra modalidad, el aptámero de la invención inhibe una función del IL-23 de ratón o una variante de esta *in vivo*. En aún otra modalidad, el aptámero de la invención evita la unión del IL-23 de ratón al receptor IL-23 de ratón. En algunas modalidades, la función del IL-23 de ratón que es modulada por el aptámero de la presente invención es mediar un modelo de enfermedad

asociado con el IL-23 de ratón tal como la encefalomielitis autoinmune, la artritis inducida por colágeno de murino, y la colitis TNBS.

[0034] En una modalidad, el aptámero de la invención tiene sustancialmente la misma capacidad de unirse al IL-23 de ratón como aquella de un aptámero que comprende una secuencia de nucleótido seleccionada del grupo que consiste de la SEQ ID NOS 124-134 y la SEQ ID NOS 199-202. En otra modalidad, el aptámero de la invención tiene sustancialmente la misma estructura y sustancialmente la misma capacidad de unirse al IL-23 de ratón que aquella de un aptámero que comprende una secuencia de nucleótido seleccionada del grupo que consiste de la SEQ ID NOS 124-134 y LA SEQ ID NOS 199-202.

[0035] En una modalidad, la presente invención suministra aptámeros que se unen a un IL-23 de ratón que comprende una secuencia de ácido nucleico al menos 80% idéntica, preferiblemente al menos 90% idéntica, con una cualquiera de las secuencias seleccionadas del grupo que cosiste de la SEQ ID NOS 124-134 y la SEQ ID NOs 199-202. En otra modalidad, la presente invención suministra aptámeros que comprenden 4 nucleótidos contiguos, preferiblemente 8 contiguos, más preferiblemente 20 nucleótidos contiguos que son idénticos a una secuencia de 4, 8 o 20 nucleótidos contiguos en la región de secuencia única de una cualquiera de las secuencias seleccionadas del grupo que consiste de la SEQ ID NOs 124-134

y las SEQ ID NOS 199-202. En otra modalidad, la presente invención suministra un aptámero capaz de unirse a IL-23 de ratón o una variante de este que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste de la SEQ ID NOS 124-134 y la SEQ ID NOS 199-202.

[0036] En una modalidad, Los materiales de la Presente invención suministran aptámeros que se unen específicamente al IL-12. En una modalidad, el IL-12 al cual los aptámeros de la invención se unen es el IL-12 humano mientras que en otra modalidad el IL-12 es una variante del IL-12 humano. En una modalidad de la variante del IL-12 desarrolla una función biológica que es esencialmente la misma que la función del IL-12 humano y tiene sustancialmente la misma estructura y substancialmente la misma capacidad de unirse a dicho aptámero como aquella del IL-12 humano.

[0037] En una modalidad, el IL-12 humano o una variante de esta comprende una secuencia de aminoácido que es al menos 80% idéntica, preferiblemente al menos 90% idéntica con una secuencia que comprende la SEQ ID NOS 4 y/o 6. En otra modalidad, el IL-12 humano o una variante de este tiene una secuencia de aminoácido que comprende las SEQ ID NOS 4 y 6.

[0038] En una modalidad, el aptámero de la presente invención modula una función del IL-12 humano o una variante de este. En una modalidad, el aptámero de la presente

247
345

invención estimula una función del IL-23 humano. En otra modalidad, el aptámero de la presente invención inhibe una función del IL-12 humano o una variante de este. En aún otra modalidad, el aptámero de la presente invención inhibe una función de IL-12 humano o una variante de esta *in vivo*. En aún otra modalidad, el aptámero de la presente invención evita que el IL-12 se una al receptor IL-12. En una modalidad, la función del IL-12 humano o una variante de esta que es modulada por el aptámero de la invención es mediar una enfermedad asociada con el IL-12 humano tal como: enfermedad autoinmune (que incluye pero ni está limitada a la esclerosis múltiple, artritis reumatoide, psoriasis, lupus eritematosos sistémico, y enfermedad irritable del intestino (por ejemplo, Enfermedad de Crohn y colitis ulcerativa), enfermedad inflamatoria, cáncer (que incluye pero no está limitado a cáncer de colon, cáncer de pulmón, metástasis de pulmón), reabsorción de hueso en la osteoporosis, y diabetes tipo I.

[0039] En una modalidad, la presente invención suministra aptámeros que son ácido ribonucleico y ácido desoxiribonucleico. En una modalidad adicional, estos aptámeros de ácido ribonucleico o ácido desoxiribonucleico son de hebra simple. En otra modalidad, la presente invención suministra aptámeros que comprenden al menos una modificación química. En una modalidad, la modificación se selecciona del grupo que consiste de: una sustitución química en una posición de azúcar; una sustitución química en una posición

346

de fosfato; y una sustitución química en una posición de base, del ácido nucleico; en la incorporación de un nucleótido modificado; terminado en 3'; conjugación de un compuesto no inmunogénico de alto peso molecular; la conjugación de un compuesto lipofílico; y la modificación de una estructura de fosfato. En una modalidad, el compuesto de alto peso molecular no inmunogénico conjugado al aptámero de la invención es polialquilen glicol, preferiblemente polietilen glico. En una modalidad, la modificación de la estructura comprende la incorporación de uno o más fosforotioatos en la estructura de fosfato. En otra modalidad, el aptámero de la invención comprende la incorporación de menos de 10, menos de 6, o menos de 3 fosfotioatos en la estructura de fosfato.

[0040] En una modalidad, los materiales de la presente invención suministran una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de un aptámero que comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste de: la SEQ ID NOS 13-66, SEQ ID NOS 71-88, SEQ ID NOS 91-96, SEQ ID NOS 103-118, SEQ ID NOS 124-130, SEQ ID NOS 135-159, SEQ ID NO 162, y SEQ ID NOS 164-172, SEQ ID NOS 176-178, SEQ ID NOS 181-196, y SEQ ID NOS 203-314, o una sal de estos, y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. En otra modalidad, los materiales de la presente invención suministran una composición farmacéutica que comprende una cantidad

347

terapéuticamente efectiva de un aptámero que comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste de la SEQ ID NO 14, SEQ ID NOS 17-19, SEQ ID NO 21, SEQ ID NOS 27-32, SEQ ID NOS 34-40, SEQ ID NO 42, SEQ ID NO 49, SEQ ID NOS 60-61, SEQ ID NOS 91-92, SEQ ID NO 94, y SEQ ID NOS 103-118, o una sal de estos, y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. En una modalidad preferida, los materiales de la presente invención suministran una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de un aptámero que comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste de la SEQ ID NO 177, SEQ ID NO 224 y SEQ ID NOS 309-312.

[0041] En una modalidad, la presente invención suministra un método para tratar, prevenir o mejorar una enfermedad mediada por IL-23, que comprende administrar la composición que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de un aptámero que comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO 13-66, SEQ ID NOS 71-88, SEQ ID NOS 91-96, SEQ ID NOS 103-118, SEQ ID NOS 124-130, SEQ ID NOS 135-159, SEQ ID NO 162, y SEQ ID NOS 164-172, SEQ ID NOS 176-178, SEQ ID NOS 181-196, y SEQ ID NOS 203-314, a un vertebrado. En otra modalidad, la presente invención suministra un método para tratar, prevenir o mejorar unas enfermedad mediada por IL-23 Y/O IL-12, que comprende administrar la composición que comprende una

348

cantidad terapéuticamente efectiva de un aptámero que comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste de la SEQ ID NO 14, SEQ ID NOS 17-19, SEQ ID NO 21, SEQ ID NOS 27-32, SEQ ID NOS 34-40, SEQ ID NO 42, SEQ ID NO 49, SEQ ID NOS 60-61, SEQ ID NOS 91-92, SEQ ID NO 94, y SEQ ID NOS 103-118, a un vertebrado. En otra modalidad, la presente invención suministra un método para tratar, prevenir o mejorar una enfermedad mediada por IL-23 y/o IL-12, que comprende administrar la composición que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de un aptámero que comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste de la SEQ ID NO 14, SEQ ID NOS 17-19, SEQ ID NO 21, SEQ ID NOS 27-32, SEQ ID NOS 34-40, SEQ ID NO 42, SEQ ID NO 49, SEQ ID NOS 60-61, SEQ ID NOS 91-92, SEQ ID NO 94, y SEQ ID NOS 103-118, a un vertebrado. En una modalidad preferida la composición comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de un aptámero administrado a un vertebrado que comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste de: SEQ ID NO 177, SEQ ID NO 224 Y SEQ ID NOS 309-312. En una modalidad el vertebrado al cual se le administra la composición farmacéutica es un mamífero. En una modalidad preferida el mamífero es un humano.

[0042] En una modalidad, la enfermedad tratada, evitada o mejorada por los métodos de la presente invención se selecciona del grupo que consiste de: enfermedad autoinmune (que incluye pero no está limitada a esclerosis múltiple,

artritis reumatoide, soriasis, lupus eritematosus sistémico, enfermedad irritable del intestino (por ejemplo Enfermedad de Crohn y colitis ulcerativa), enfermedad inflamatoria, cáncer (que incluye pero no está limitado a cáncer de colon, cáncer de pulmón, y metástasis de pulmón), reabsorción de hueso en la osteoporosis y diabetes tipo I.

[0043] En una modalidad, la presente invención suministra un método o diagnostico que comprende poner en contacto un aptámero con una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste de: SEQ ID NO 13-66, SEQ ID NOS 71-88, SEQ ID NOS 91-96, SEQ ID NOS 103-118, SEQ ID NOS 124-134, SEQ ID 162, y SEQ ID NOS 164-172, SEQ ID NOS 176-178, SEQ ID NOS 181-196, y SEQ ID NOS 199-314 con una composición que se sospecha que comprende ILÑ-23 y/o IL-12 o una variante de estos, y detectar la presencia o ausencia del IL-23 y/o IL-12 o una variante de estos.

[0044] En una modalidad, la presente invención, suministra un aptámero con una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO 13-66, SEQ ID NOS 71-88, SEQ ID NOS 91-96, SEQ ID NOS 103-118, SEQ ID NOS 124-134, SEQ ID NOS 135-159, SEQ ID NO 162, y SEQ ID NOS 164-172, SEQ ID NOS 176-178, SEQ ID NOS 181-196, y SEQ ID NOS 199-314 para uso como diagnostico *in vitro*. En otra modalidad, la presente invención suministra un aptámero con una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO 13-

350

66, SEQ ID NOS 71-88, SEQ ID NOS 91-96, SEQ ID NOS 103-118, SEQ ID NOS 124-134, SEQ ID NOS 135-159, SEQ ID NO 162, y SEQ ID NOS 164-172, SEQ ID NOS 176-178, SEQ ID NOS 181-196, y SEQ ID NOS 199-314 para uso como un diagnostico *in vivo*. En aún otra modalidad, la presente invención suministra un aptámero con una sescuncia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste de las SEQ ID NOs 13-66, SEQ ID NOS 71-88, SEQ ID NOS 91-96, SEQ ID NOS 103-118, SEQ ID NOS 124-134, SEQ ID NOS 135-159, SEQ ID NO 162, y SEQ ID NOS 164-172, SEQ ID NOS 176-178, SEQ ID NOS 181-196, y SEQ ID NOS 199-314 para uso en el tratamiento, prevención o mejoramiento de enfermedad *in vivo*.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0045] La figura 1 es una representación esquemática de la interleuquina -12 de la familia de las citoquinas.

[0046] La figura 2 es una representación esquemática de la selección de aptámero *in vitro* (SELEX™) procesos de grupos de oligonucleótidos de secuencia aleatoria.

[0047] La figura 3 es esquemática deL esquema de selección in vitro para seleccionar los aptámeros específicos al IL-23 al incluir el IL-12 en la etapa de selección negativa eliminando de esta manera las secuencias que reconocen el p40, la subunidad común tanto en IL-12 como IL-23.

[0048] La figura 4 es una ilustración de un PEG ramificado de 40 kDa.

[0049] La figura 5 es una ilustración de un PEG ramificado de 40 kDa unido al extremo 5 de un aptámero.

[0050] La figura 6 es una ilustración que describe varias estrategias de PEGilación que representan la mono-PEGilación estándar, la PEGilación múltiple, y la dimerización por vía de PEGilación.

[0051] La figura 7 es una grafica que muestra la unión de los grupos rRmY y rGmH al IL-23 después de varias rondas de selección.

[0052] La figura 8A es un esquema representativo de la secuencia de la configuración de las estructuras secundarias predichas de los aptámeros IL-23 tipo 1; la figura 8B es un esquema representativo de las secuencias y la configuración de la estructura secundaria predicha de varios aptámeros tipo 2 IL-23.

[0053] La figura 9A prevalece un esquema de de las secuencias de aptámero minimizadas de las configuraciones de estructuras secundarias predichas para aptámeros IL-23 tipo 1; la figura 9B es esquemática de la secuencia de aptámero

352

minimizada y las configuraciones de estructura secundaria para aptámeros IL-23 tipo 2.

[0054] La figura 10 describe la estructura del cuarteto G predicha para el dRmY minímero ARC979 (SEQ ID NO 177).

[0055] La figura 11 es una gráfica que muestra el incremento de la fluorescencia NMM en ARC979 (SEQ ID NO 177), que confirma que el ARC979 adopta una estructura de cuarteto G.

[0056] La figura 12 es una gráfica de La curva de unión de competición del ARC979 (SEQ ID NO 177), analizada con base n la unión total [aptámero] que utiliza 50 nM de IL-23.

[0057] La figura 13 es una gráfica de la curva de unión de competición del ARC979 (SEQ ID NO 177), analizada con base en la unión [aptámero] que utiliza 250 nM de IL-12.

[0058] La figura 14 es una gráfica de las curvas de unión directas para el ARC979 (SEQ ID NO 177), bajo dos diferentes condiciones de reacción de unión (IXPBS (SIN Ca^{++} o Mg^{++}) o IX Dulbeccos PBS (CON Ca^{++} y Mg^{++}).

[0059] La figura 15 es una gráfica de las curvas de unión directas de los derivados de fosforotioato de ARC979 (SEQ ID

353

NO 177) que describe la sustitución de fosforotioato simple que producen una unión de proporción incrementada al IL-23.

[0060] La figura 16 es una gráfica de las curvas de unión para los derivados de fosforotioato ARC979 (SEQ ID NO 177) que describe que la sustitución de fosforotioato simple compiten para el IL-23 a una afinidad mayor que ARC979.

[0061] La figura 17 es una gráfica de lasa curvas de unión directas para los derivados optimizados ARC1624 (SEQ ID NO 310) y ARC1625 (SEQ ID NO 311), comparado con el aptámero ARC979 padre (SEQ ID NO 177) (ARC895 es de control negativo).

[0062] La figura 18 es una gráfica que describe la estabilidad de plasma del ARC979 (SEQ ID NO 177) comparado con las construcciones de los derivados ARC979 optimizados.

[0063] La figura 19 es una representación esquemática del ensayo TransAM™ utilizado para medir la actividad STAT3 en listados de células de blasto PHA dispuestas a los aptámeros de la invención.

[0064] La figura 2 es un diagrama de flujo del protocolo utilizado para la detección del IL-23 inducido por fosforilación del STAT3 en los Blastos PHA expuestos a los aptámeros de la invención.

[0065] La figura 21 es una gráfica representativa que muestra el efecto inhibitorio de los aptámeros IL-23 parenterales de la composición rRfY comparada con sus respectivos clones optimizados sobre la fosforilación SAT3 inducida por IL-23 en Blastos PHA que utilizan el ensayo TransAM™.

[0066] La figura 22 es una gráfica de la inhibición porcentual de la fosforilación STAT3 inducida por IL-23 mediante los aptámeros IL-23 de la composición dRmY en el ensayo transAM™ (ARC793) (SEQ ID NO 163) que es un aptámero de no unión).

[0067] La figura 23 es una gráfica de la inhibición porcentual de la forforilación STAT3 inducida por IL-23 mediante los aptámeros IL-23 de la composición dRmY (ARC621) (SEQ ID NO 108), ARC627 (SEQ ID NO 110)) comparado con sus respectivos clones optimizados (ARC979 (SEQ ID NO 177), ARC980, (SEQ ID NO 178), ARC982 (SEQ ID NO 180) en el ensayo TransAM™.

[0068] La figura 24 es una gráfica de la inhibición porcentual del IL-23 inducido por la fosforilación de STAT3 por ARC979 (SEQ ID NO 177) y dos clones derivados optimizados del ARC979 (ARC1624)(SEQ ID NO 310) y ARC1625 (SEW ID NO 311)) en un ensayo Pathscan® .

[0069] La figura 25 es un gráfica que compara la activación del STAT3 inducido por IL-23 de humano y de ratón en Blastos PHA de humano, medidos mediante el ensayo TransAM™.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

[0070] Los detalles de una o más modalidades de la invención se establecen en la descripción que acompaña adelante. Aunque cualquier método y materiales similares equivalentes a aquellos descritos aquí se pueden utilizar en la práctica o ensayo de la presente invención, los métodos y materiales preferidos son ahora descritos. Otras características, objetos y ventajas de la invención serán evidentes de la descripción. En la especificación, las formas singulares también incluyen las plurales a menos que el contexto claramente dicte otra cosa. A menos que se defina de otra manera, todos los términos técnicos y científicos utilizados aquí tienen el mismo significado que se entiende comúnmente por un extracto en la técnica al cual pertenece la invención. En el caso de conflicto, la presente especificación será el control.

EL MÉTODO SELEX™

[0071] Un método adecuado para generar un aptámero es con el proceso titulado "Systematic Evolution of Ligands

Enrichment" ("SELEX™") descrito de manera general n la Figura 2. El proceso SELEX™ es un método para evolución *in vitro* de moléculas de ácido nucleico con una unión altamente especifica para las moléculas blanco y se describe en, por ejemplo, la Solicitud de Patente Ser. No. 07/536,428, presentada en Enero 11, 1990, ahora abandonada, la Patente U.S. No. 5,375,096 titulada "Nucleic Acid Ligands", y la Patente U.S. No. 5,270,163 (ver también WO 91/19813) titulada "Nucleic Acid Ligands". Cada ligando de ácido nucleico identificado SELEX™. Es decir, cada aptámero es un ligando especifico de un compuesto o molécula blanco dado. El proceso SELEX™ que está basado en la única interioridad de qur los ácidos nucleicos tienen suficiente capacidad para formar una variedad de estructuras di o tri dimensionales y suficiente versatilidad química disponible dentro de los monómeros para actuar como ligandos (es decir formar pares de unión específico) con virtualmente cualquier compuesto químico, sea monomérico o polimérico. Las moléculas de cualquier tamaño o composición pueden servir como blancos.

[0072] El SELEX™ confía como un punto de partida luego de una librería o grupo grande de oligonucleótidod de hebra simple que comprenden secuencias aleatorisadas. Los oligonucleótidos pueden ser ADN, ARN, o hibridos ADN/ARN modificados o no modificados. En algunos ejemplos, los grupos comprenden oligonucleótidos 100% aleatorios o parcialmente aleatorios. En otros ejemplos, los grupos comprenden

oligonucleótidos aleatorios o parcialmente aleatorios que contienen al menos una secuencia fija y/o la secuencia conservada e incorporada dentro de la secuencia aleatorizada. En otros ejemplos, el grupo comprende oligonucleótidos aleatorios o parcialmente aleatorios que contiene al menos una secuencia fija y/o la secuencia conservada en su extremo 5′ y/o 3′ el cual puede comprender una secuencia compartida sobre todas las moléculas de grupo de oligonucleótidos. Las secuencias fijas son secuencias comunes a los oligonucleótidos en el grupo que se incorporan para un propósito pre seleccionado tal como, los motivos CpG descritos adicionalmente adelante, los sitios de hibridización para los iniciadores PCR, las secuencias promotoras para las polimerasas ARN (por ejemplo T3, T4, T7, y SP6), los sitios de restricción, o las secuencias homo polimérica, tales como los tractos Poli A o Poli T, los núcleos catalíticos, los sitios para la unión selectiva a columnas de afinidad, y otras secuencias para facilitar la clonación y/o la secuenciación de un oligonucleótido de interés. Las secuencias conservadas son secuencias, diferentes de las secuencias fijas previamente descritas, compartidas por un número de aptámeros que se unen al mismo blanco.

[0073] Los oligonucleótidos de grupo incluye preferiblemente una porción de secuencia aleatorizada así como también las secuencias fijas necesarias para la

amplificación eficiente. Típicamente los oligonucleótidos del grupo de partida contienen secuencias terminales 5' y 3' fijas que flanquean una región interna de 30-50 nucleótidos aleatorios. Los nucleótidos aleatorizados se pueden producir mediante un número de formas que incluyen la síntesis química y la selección de tamaño de los ácidos nucleicos celulares aleatoriamente privados. La variación de la secuencia en los ácidos nucleicos de ensayo también se introduce o se incrementa por la mutagénesis antes o durante las interacciones de selección/amplificación

[0074] La porción de la secuencia aleatoria de los oligonucleótidos puede ser de cualquier longitud y puede comprender ribonucleótidos y/o desoxiribonucleótidos y puede incluir nucleótidos modificados o no naturales o Análogos de nucleótido. Ver, por ejemplo la Patente U.S 5,958,691; La Patente U.S No. 5,660,985; La Patente U.S. No. 5,958,691; la Patente U.S. No. 5,698,687; la Patente U.S. No. 5,817,635; la Patente U.S. No. 5,672,695, y la Publicación PCT WO 92/07065. Random Los oligonucleótidos aleatorios se pueden sintetizar de oligonucleótidos ligados a fosfodiéster que utiliza técnicas de síntesis de oligonucleótido de fase sólida bien conocidas en la técnica. Ver, por ejemplo, Froehler *et al.*, Nucl. Acid Res. 14: 5399-5467 (1986) y Froehler *et al.*, Tet. Lett. 27: 5575-5578 (1986). Los oligonucleótidos aleatorios también se pueden sintetizar utilizando métodos de fase de solución tal como los métodos de síntesis de triéster. Ver,

por ejemplo, Sood *et al.*, Nucl. Acid Res. 4: 2557 (1977) y Hirose *et al.*, Tet. Lett. 28: 2449 (1978). La síntesis típica llevada a cabo sobre un equipo de síntesis de ADN automatizado produce 10^{14}-10^{16} moleculas individuales, un número suficiente para la mayoría de los experimentos SELEX™. Las regiones suficientemente grandes de secuencias aleatorias en el diseño de secuencia incrementa la probabilidad de cada molécula sintetizada represente probablemente una secuencia y única.

[0075] La librería de partida de los oligonucleótidos se puede generar mediante síntesis química automatizada a un sintetizador de AN. Para sintetizar las secuencias aleatorizadas las mezclas de todos los 4 nucleótidos se agregan a cada etapa de adición de nucleótido durante el proceso de síntesis, permitiendo la incorporación aleatoria de los nucleótidos. Como se estableció anteriormente, en una modalidad, los oligonucleótidos aleatorios comprenden secuencias completamente aleatorias; sin embargo, en otras modalidades, los oligonucleótidos aleatorios pueden comprender estiramientos de secuencias no aleatorias o parcialmente aleatorias. Las secuencias parcialmente aleatorias se pueden quedar al agregar los 4 oligonucleótidos en diferentes proporciones molares en cada etapa de adición.

[0076] La librería de partida de los oligonucleótidos puede ser ARN o ADN. En aquellos casos en donde la librería

366

de ARN va a ser utilizada como librería de partida es típicamente generada al transcribir la librería de ADN *in vitro* utilizando polimerasa ARN T7 o polimerasas ARN 7T modificadas y purificadas. Las librerías ARN o ADN son entonces mezcladas con los blancos bajo condiciones favorables para unir y someter las iteracciones en forma de paso de unión, mediante partición o amplificación utilizando el mismo esquema de selección general, para lograr virtualmente cualquier criterio deseado de afinidad de unión y selectividad. Más específicamente, partiendo con una mezcla que contiene un grupo de partida de ácidos nucleicos, el método SELEX™ incluye las etapas de: (a) poner en contacto la mezcla con el blanco bajo condiciones favorables para la unión; (b) particionar los ácidos nucleicos no unidos de aquellos ácidos nucleicos que tienen que sean específicamente unido a las moléculas blanco; (c) disociar los complejos de ácido nucleico-blanco; (d) amplificar los ácidos nucleicos disociados de los complejos de ácido nucleico-blanco para producir una ligando-mezcla enriquecida de ácido nucleico; y (e) reiterar las etapas de unir, particionar disociar y amplificar a través de muchos ciclos como se desea para producir ligándoos de ácido nucleico altamente específicos, de alta afinidad a la molécula blanco. En aquellos casos donde los aptámeros de ARN sin seleccionados, el método SELEX™ comprende además las etapas de (i) transcribir de manera inversa los ácidos nucleicos disociados de los complejos de ácido nucleico-blanco antes de la amplificación

en la etapa (d); (ii) transcribir los ácidos nucleicos amplificados de la etapa (d) antes de iniciar los procesos.

[0077] Dentro de una mezcla de ácido nucleico que contiene y un gran número de posibles secuencias y estructuras, existe un amplio rango de afinidades de unión para un blanco dado. Una mezcla de ácido nucleico que comprende, por ejemplo, un segmento aleatorizado de 20 nucleótidos puede tener 4^{20} posibilidades de candidatos. Aquellos que tienen constantes de alta de mayor afinidad para los blancos se unen de manera más probable al blanco. Después de particionar, la disociación y la amplificación se genera una segunda mezcla de ácido nucleico, enriquecida por los candidatos de mayor afinidad de unión. Las rondas adicionales de selección favorecen progresivamente a los mejores ligandos hasta que la mezcla de ácido nucleico resultante está predominantemente compuesta de solamente una o pocas secuencias. Estos pueden ser clonados, secuenciados e individualmente ensayados para afinidad de unión como ligandos o aptámeros puros.

[0078] Los ciclos de la selección y amplificación son repetidos hasta que se logre la meta deseada. En el caso más general, la selección/amplificación se continúa hasta que no se logra ninguna mejora significativa en el poder de unión sobre la repetición del ciclo. El método se utiliza típicamente para muestrear aproximadamente 10^{14} diferentes especies de ácido nucleico pero se debe utilizar para

muestrear tanto como 10^{18} diferentes especies de ácido nucleico. De manera general, las moléculas de aptámero de ácido nucleico se seleccionan en un procedimiento de 5 a 20 ciclos. En una modalidad, la heterogeneidad se introduce solamente en las etapas de selección inicial y no ocurre a través de los procesos de replicación.

[0079] En una modalidad del SELEX™, el proceso de selección es tan eficiente al aislar estos ligandos de ácido nucleico que se unen más fuertemente al blanco seleccionado, que solamente se requiera un ciclo de selección y amplificación. Tal selección eficiente puede ocurrir, por ejemplo, en un proceso tipo cromatográfico en donde la capacidad de los ácidos nucleicos a asociarse con los blancos unidos sobre una columna operan de tal manera que la columna es suficientemente capaz de permitir la separación y el aislamiento de los ligandos de ácido nucleico de más alta afinidad.

[0080] En muchos casos, no es necesariamente deseable desarrollar las etapas iterativas del SELEX™ hasta que se identifica el ligando de ácido nucleico simple. La solución del ligando de ácido nucleico especifica de blanco puede incluir una familia de estructuras de ácido nucleico o motivos que tengan un número de secuencias conservadas y un número de secuencias que se puedan sustituir o agregar sin afectar significativamente la afinidad de los ligandos de

363

ácido nucleico al blanco. Al terminar el proceso SELEX™ antes de completarse, es posible determinar la secuencia de un número de miembros de la familia de solución de ligando de ácido nucleico.

[0081] Una variedad de estructuras primaria, secundaria y terciaria de ácido nucleico son conocidas que existen. Las estructuras o motivos que se han mostrado más comúnmente involucradas en las interacciones tipo no Watson-Crick se denominan como estructuras en orquilla, abombamientos simétricos y asimétricos, seudo nudos y miríadas de combinaciones de los mismos. Casi todos los casos conocidos de tales motivos sugieren que ellos se pueden formar en una secuencia de ácido nucleico de no más de 30 nucleótidos. Por esta razón, se prefiere a menudo que los procedimientos SELEX™ con segmentos aleatorizados contiguos se inicien con secuencias de ácido nucleico que contienen un segmento aleatorizado de entre aproximadamente 20 a aproximadamente 50 nucleótidos y en algunas modalidades, aproximadamente 30 a aproximadamente 40 nucleótidos. En un ejemplo, la secuencia fija 5'-aleatoria fija: 3' comprende una secuencia aleatoria de aproximadamente 30 a aproximadamente 50 nucleótidos.

[0082] El método SELEX™ de núcleo se ha modificado para lograr un número de objetivos específicos. Por ejemplo, la patente U.S. No. 5,707,796 describe el uso del SELEX™ en conjunto con la electroforesis de gel a las moléculas de

ácido nucleico seleccionadas con características estructurales específicas, tales como el ADN doblado. La patente U.S. No.5,763,177 describe los métodos basados en SELEX™ para seleccionar los ligando de ácido nucleico que contienen grupos foto reactivos capaces de unirse y/o foto reticulantes y/o foto inactivantes a una molécula blanco. La patente U.S. No. 5,567,588 y la patente U.S. No. 5,861,254 describe los métodos basados en SELEX™ que logran particionamiento altamente eficiente entre los oligonucleótidos que tienen afinidad alta y baja para la molécula blanco. La patente U.S. No. 5,496,938 describe los métodos para obtener ligandos de ácido nucleico mejorados después de que el proceso SELEX™ se ha desarrollado. La patente U.S. No. 5,705,337 describe métodos para ligar covalentemente un ligando a su blanco.

[0083] El SELEX™ también se puede utilizar para obtener ligandos de ácido nucleico que se unen a más de un sitio sobre la molécula blanco, y para obtener ligandos de ácido nucleico que incluyen especies de ácido no nucleico que se unen a sitios específicos sobre el blanco. El SELEX™ suministra medios para aislar e identificar los ligandos de ácido nucleico que se unen a cualquier blanco previsible, que incluyen moléculas grandes y pequeñas tales como proteínas que se unen al ácido nucleico y proteínas no conocidas que se unen a ácidos nucleicos como parte de su función biológica así como también cofactores de otras moléculas pequeñas. Por

ejemplo, la Patente U.S. No. 5,580,737 describe secuencias de ácido nucleico identificadas a través del SELEX™ que son capaces de unirse con alta afinidad a cafeína y al análogo cercanamente relacionado, teofilina.

[0084] El contra SELEX™ es un método para mejorar la especificidad de los ligandos de ácido nucleico a una molécula blanco para eliminar las secuencias del ligando de ácido nucleico con reactividad cruzada a una o más moléculas no blanco. El contra SELEX™ esta comprendido de la etapas de:(a) preparar una mezcla candidato de ácido nucleico; (b)poner en contacto las mezclas candidato con el blanco, en donde los ácidos nucleicos que tienen una afinidad creciente con el blanco con relación a la mezcla candidato se puede particionar del resto de la mezcla candidato; (c) particionar los ácidos nucleicos de afinidad creciente del resto de la mezcla candidato; (d) disociar los ácidos nucleicos de afinidad creciente del blanco; (e) poner en contacto los ácidos nucleicos de afinidad creciente con una o más moléculas no blanco de tal forma que son removidos los ligandos de ácido nucleico con afinidad específica para el o las moléculas no blanco; (f) amplificar los ácidos nucleicos con afinidad específica solamente por la molécula blanco para producir una mezcla de ácidos nucleicos enriquecidos para las secuencias de ácido nucleico con una afinidad relativamente mayor y una especificidad para la unión a la molécula blanco. Como se describió anteriormente para el SELEX™, los ciclos de

366

la selección y amplificación son repetidos según sea necesario hasta que se obtenga la meta deseada.

[0085] Un problema potencial encontrado en el uso de los ácidos nucleicos como terapéuticos y vacunas es que los oligonucleótidos en su forma fosfodiéster puede ser rápidamente degradada en los fluidos del cuerpo mediante encimas intracelulares y extracelulares tal como las endonucleasas y exonucleasas antes de que se manifieste el efecto deseado. El método SELEX™, comprende así la identificación de los ligandos de ácido nucleico de alta afinidad que contiene los nucleótidos modificados que confieren características mejoradas sobre el ligando, tal como estabilidad mejorada *in vivo* características de suministro mejoradas. Los ejemplos de tales modificaciones incluyen sustituciones químicas de la ribosa y/o fosfato y/o posiciones base. El SELEX™ ligandos de ácido nucleico identificados que contienen nucleótidos modificados se describe, por ejemplo, en la patente U.S. No. 5,660,985, que describe los oligonucleótidos que contienen los derivados de nucleótido químicamente modificados en la posición 2'de ribosa, posición 5 de pirimidina, y posición 8 de purinas, en la Patente U.S. No. 5,756,703 que describe los oligonucleótidos que contienen varias pirimidinas modificadas en 2', y la Patente U.S. No. 5,580,737 que describe ligandos de ácido nucleico altamente específicos que contienen uno o

más nucleótidos modificados con los sustituyentes 2'-amino (2'-NH_2), 2'-fluoro (2'-F), y/o 2'-O-metil (2'-OMe).

[0086] Las modificaciones de los ligandos de ácido nucleico contempladas en esta invención incluyen, pero no están limitadas a, aquellas que suministran otros grupos químicos que incorporan cargas adicionales, polarizabilidad, hidrofobicidad, unión de hidrógeno, interacción electroestática, y funcionalidad a las bases de ligando de ácido nucleico o al ligando de ácido nucleico como un todo. Las modificaciones para generar las poblaciones de nucleótidos que son resistentes a las nucleasas también pueden incluir uno o más enlaces de ínter nucleótido sustitutos, azucares alterados, bases alteradas, o combinaciones de estos. Tales modificaciones incluyen, pero no están limitadas a, modificaciones en el azúcar de la posición 2', modificaciones en la pirimidina de la posición 5, modificaciones en la purina de la posición 8, modificaciones en las aminas exocíclicas, sustitución de 4-tiouridina, sustitución de 5-bromo o 5-yodo-uracilo; modificaciones de la estructura, modificaciones de fosforotioato o alquil fosfato, metilaciones, y combinaciones de pares base inusuales tales como isocitidina de isobases e isoguanosina. Las modificaciones también pueden incluir las modificaciones 3' y 5' tales como la caperuza.

[0087] En una modalidad, se suministran oligonucleótidos en los cuales el grupo P(O)O se reemplaza por P(O)S ("tioato"), P(S)S ("ditioato"), $P(O)NR_2$ ("amidato"), P(O)R, P(O)OR; CO o CH_2 ("formacetal") o 3'-amina ($-NH-CH_2-CH_2-$), en donde cada R o R' es independientemente H o alquilo sustituido o no sustituido. Los grupos de enlace se pueden unir a nucleótidos adyacentes a través de un enlace -O-, -N-, o -S-. No todos los enlaces en los oligonucleótidos se requiere que sean idénticos. Como se utilizó aquí, el término fosforotioato comprende uno o más átomos de oxígeno sin puente en una unión fosfodiéster reemplazada por uno o más átomos de azufre.

[0088] En modalidades adicionales, los oligonucleótidos comprenden grupos de azúcar modificados, por ejemplo, uno o más de los grupos hidroxilo es reemplazado con halógeno, grupos alifáticos, o funcionarizados como éteres o aminas. En una modalidad, la posición 2' del residuo furanosa es sustituida por cualquiera de los grupos O-metilo, O-alquilo, O-alilo, S-alquilo. S-alilo. o halo. Los métodos de síntesis de los azucares 2'-modificados se describen, por ejemplo, en Sproat, et al., Nucl. Acid Res. 19:733-738 (1991); Cotten, et al., Nucl. Acid Res. 19:2629-2635 (1991); y Hobbs, et al., Biochemistry 12:5138-5145 (1973). Otras modificaciones son conocidas por un experto en la técnica. Tales modificaciones pueden ser modificaciones del proceso pre-SELEX™ o modificaciones del proceso post- SELEX™ (modificación de

ligandos no modificados previamente identificados) o se pueden hacer mediante la incorporación del proceso SELEX™.

[0089] Las modificaciones del proceso pre- SELEX™ o aquellas hechas mediante la incorporación en el proceso SELEX™ que producen ligandos de ácido nucleico con tanto especificidad para el blanco SELEX™ como estabilidad mejorada, por ejemplo, estabilidad *in vivo*. Las modificaciones del proceso post- SELEX™ hechas a los ligandos de ácido nucleico pueden dar como resultado una estabilidad mejorada, por ejemplo, estabilidad *in vivo* sin afectar adversamente la capacidad de unión del ligando de ácido nucleico.

[0090] El método SELEX™ comprende combinar los oligonucleótidos seleccionados con otros oligonucleótidos seleccionados y unidades funcionales de no oligonucleótido como se describe en la Patente U.S. No. 5,637,459 y Patente U.S. No. 5,683,867. El método SELEX™ comprende además combinar los ligandos de acido nucleico seleccionados con compuestos no inmunogénicos de alto peso molecular en un diagnóstico o complejo terapéutico, como se describió, por ejemplo, en la Patente U.S. No. 6,011,020, la Patente U.S. No. 6,051,698, y la publicación PCT No. WO98/18480. Esas patentes y solicitudes enseñan la combinación de un arreglo amplio de formas y otras propiedades, con la amplificación eficiente y las propiedades de replicación de

370

oligonucleótidos, y con las propiedades deseables de otras moléculas.

[0091] La identificación de los ligandos de ácido nucleico a péptidos pequeños, flexibles por vía del método SELEX™ también se ha explorado. Los péptidos pequeños tienen estructuras flexibles y usualmente existen en solución en equilibrio de conformadores múltiples, y así se pensó inicialmente que las afinidades de unión se pueden limitar por la entropía conformacional perdida luego de la unión a un péptido flexible. Sin embargo, la factibilidad de identificar los ligandos de ácido nucleico a los péptidos pequeños en solución se demostró en la Patente U.S. No. 5,648,214. En esta patente, los ligandos de ácido nucleico de ARN de alta afinidad a la sustancia P, un péptido de 11 amino ácidos, se identificó.

[0092] Los aptámeros con especificidad y afinidad de unión a él o los blancos de la presente invención se seleccionan típicamente por el proceso SELEX™ como se describió aquí. Como parte del proceso SELEX™, las secuencias seleccionadas para unirse al blanco son luego opcionalmente minimizadas para determinar la secuencia mínima que tiene la afinidad de unión deseada. Las secuencias seleccionadas y/o las secuencias minimizadas son opcionalmente utilizadas al desarrollar muta génesis aleatoria o dirigida de la secuencia para incrementar la afinidad de unión o alternativamente para

Exp. 371

determinar que posiciones en la secuencia son esenciales para la actividad de unión. Adicionalmente, las selecciones se pueden desarrollar con secuencias que incorporan los nucleótidos modificados para estabilizar las moléculas de aptámero contra la degradación *in vivo*.

SELEX™ 2'MODIFICADO

[0093] Con el fin de que un aptámero sea adecuado para usar como un terapéutico, éste es preferiblemente no costoso de sintetizar, seguro y estable *in vivo*. Los aptámeros de ARN y ADN tipo silvestre son típicamente no estables *in vivo* en razón de su susceptibilidad a la degradación por las nucleasas. La resistencia a la degradación por las nucleasas puede ser mayormente incrementada mediante la incorporación de grupos modificantes en la posición 2'.

[0094] Los grupos fluoro y amino han sido exitosamente incorporados en los grupos de oligonucleótidos de los cuales los aptámeros han sido subsecuentemente seleccionados. Sin embargo, estas modificaciones incrementan mayormente el costo de síntesis del aptámero resultante, y pueden introducir preocupaciones de seguridad en algunos casos en razón de la posibilidad de que los nucleótidos modificados pudieran ser reciclados en el ADN huésped mediante la degradación de los oligonucleótidos modificados y el subsecuente uso de los nucleótidos como sustratos para la síntesis de ADN.

[0095] Los aptámeros que contienen los nucleótidos 2'-O-metilo ("2'-OMe"), como se suministra aquí, solucionan muchos de estos inconvenientes. Los oligonucleótidos que contienen los nucleótidos 2'-OMe son resistentes a las nucleasas y poco costosos de sintetizar. Aunque los nucleótidos 2'-OMe son ubicuos en los sistemas biológicos, las polimerasas naturales no aceptan los 2'-OMe NTP como sustratos bajo condiciones fisiológicas, así no existen preocupaciones de seguridad sobre el reciclamiento de los nucleótidos 2'-OMe en un ADN huésped. El método SELEX™ utilizado para generar los aptámeros 2'-modificados como se describió, por ejemplo, en la Solicitud de Patente Provisional U.S. Serie No. 60/430,761, presentada en diciembre 3, 2002, la Solicitud de Patente Provisional U.S. Serie No. 60/487,474, presentada en julio 15, 2003, la Solicitud de Patente Provisional U.S. Serie No. 60/517,039, presentada en noviembre 4, 2003, la Solicitud de Patente U.S. No. 10/729,581, presentada en diciembre 3, 2003, y La Solicitud de Patente U.S. No. 10/873,856, presentada en junio 21, 2004, titulada "Method for *in vitro* Selection of 2'-O-metil Substituted Nucleic Acids",cada una de las cuales se incorpora aquí como referencia en su totalidad.

[0096] La presente invención incluye los aptámeros que se unen a y modulan la función de IL-23 y/o IL-12 que contiene los nucleótidos modificados (por ejemplo, nucleótidos que

tienen una modificación en la posición 2') para hacer los oligonucleótidos más estables que los oligonucleótidos no modificados a la degradación enzimática y química así como también a la degradación térmica y física. Aunque existen varios ejemplos de aptámeros que contienen 2'-OMe en la literatura (ver, por ejemplo, Green et al., Current Biology 2,683-695, 1995) éstos fueron generados mediante selección *in vitro* de librerías de transcriptos modificados en los cuales los residuos C y U fueron 2'-fluoro (2'-F) sustituidos y los residuos A y G fueron 2'-OH. Una vez la secuencias funcionales se identificaron entonces cada uno de los residuos A y G se ensayó para la tolerancia a la sustitución de 2'-OMe, y el aptámero se resintetizó teniendo todos los residuos A y G los cuales toleraron la sustitución 2'-OMe como los residuos 2'-OMe. La mayoría de los residuos A y G de los aptámeros generados en esta sustitución toleran la forma de dos etapas con los residuos 2'-OMe, aunque, en promedio, aproximadamente el 20% no. Consecuentemente, los aptámeros generados utilizando este método tienden a contener de dos a cuatro residuos 2'-OH, y la estabilidad y costo de la síntesis se compromete como un resultado. Al incorporar los nucleótidos modificados en la reacción de transcripción que generan los oligonucleótidos estabilizados utilizados en los grupos de oligonucleótidos de los cuales son seleccionados los aptámeros y enriquecidos por el SELEX™ (y/o cualquiera de sus variaciones y mejoras, que incluyen aquellas descritas aquí), los métodos de la presente invención eliminan la

necesidad de estabilizar los oligonucleótidos de aptámero seleccionados (por ejemplo, al resintetizar los oligonucleótidos de aptámero con los nucleótidos modificados).

[0097] En una modalidad, la presente invención suministra aptámeros que comprenden combinaciones de 2'-OH, 2'-F, 2'-desoxi, y las modificaciones 2'-OMe de los nucleótidos ATP, GTP, CTP, TTP, Y UTP. En otra modalidad, la presente invención suministra los aptámeros que comprenden las combinaciones de las modificaciones 2'-OH, 2'-F, 2'-desoxi, 2'-OMe, 2'-NH_2, y 2'-metoxietilo de los nucleótidos ATP, GTP, CTP, TTP, y UTP. En otra modalidad, la presente invención suministra los aptámeros que comprenden 5^6 combinaciones de las modificaciones 2'-OH, 2'-F, 2'-desoxi, 2'-OMe, 2'-NH_2, y 2'-metoxietilo de los nucleótidos ATP, GTP, CTP, TTP, Y UTP.

[0098] Los aptámeros 2' modificados de la invención son creados utilizando polimerasas modificadas, por ejemplo, una polimerasa T7 modificada, que tiene una proporción de incorporación de nucleótidos modificados que tienen sustituyentes en masa en la posición 2' de furanosa que es mayor que aquella de las polimerasas tipo silvestre. Por ejemplo, en una polimerasa T7 mutante simple (Y639F) en la cual el residuo de tirosina en la posición 639 ha sido cambiado por fenilalanina utiliza fácilmente la 2'desoxi, 2'amino-, 2'fluoro-nucleótido trifosfatos (NTP) como

sustratos y han sido ampliamente utilizados para sintetizar los ARN modificados para una variedad de aplicaciones. Sin embargo, esta polimerasa T7 mutante no puede reportadamente utilizar (es decir, incorporar) los NTP con los sustituyentes 2′ de masa tales como los sustituyentes 2′-OMe o 2′-acido (2′-N_3). Para la incorporación de los sustituyentes 2′ de masa, un mutante de polimerasa T7 doble (Y639F/H784A) que tiene la histidina en la posición 784 cambió a un residuo de alanina en adición a la mutación Y639F que ha sido descrita y ha sido utilizada en circunstancias limitadas para incorporar los NTP de la pirimidina modificada. Ver Padilla, R. and Sousa, R., Nucleic Acids Res., 2002, 30(24):138. Una polimerasa T7 mutante simple (H784A) que tiene la histidina en la posición 784 cambiado a un residuo alanina también ha sido descrita. Padilla et al., Nucleic Acids Research, 2002, 30:138. En ambas polimerasas T7 la mutante doble Y639F/H784A y la mutante simple H784A, el cambio al residuo de amino ácido más pequeño tal como alanina permite la incorporación de sustratos de nucleótido con más masa, por ejemplo, los nucleótidos sustituidos 2′-OMe.

[0099] De manera general, se ha encontrado que bajo las condiciones descritas aquí, el mutante simple Y693F se puede utilizar para la incorporación de todos los NTP 2′-OMe sustituidos excepto el GTP y el mutante doble Y639F/H784A se puede utilizar para la incorporación de todos los NTP 2′-OMe sustituidos que incluyen el GTP. Se espera que el mutante

simple H784A posea propiedades similares a los mutantes Y639F y Y639F/H784A utilizados bajo las condiciones descritas aquí.

[00100] Los oligonucleótidos 2'-modificados pueden ser sintetizados completamente de nucleótidos modificados, o con un subconjunto de nucleótidos modificados. Las modificaciones pueden ser iguales o diferentes. Todos los nucleótidos se pueden modificar, y todos pueden contener las mismas modificaciones. Todos los nucleótidos se pueden modificar, pero contener diferentes modificaciones, por ejemplo, todos los nucleótidos que contienen las mismas bases pueden tener un tipo de modificación, mientras que los nucleótidos que contienen otras bases pueden tener diferentes tipos de modificación. Todos los nucleótidos de purina pueden tener un tipo de modificación (o ser no modificados), mientras que todos los nucleótidos de pirimidina tienen otro, tipo diferente de modificación (o son no modificados). De esta manera, los transcriptos, o grupos de transcriptos son generados utilizando cualquier combinación de modificaciones, que incluyen por ejemplo, los ribonucleótidos (2'-OH), los desoxiribunocleótidos (2'-desoxi), los nucleótidos 2'-F, y 2'-OMe. Una mezcla de transcripción que contiene 2'-OMe C y U y 2'-OH A y G se denomina como una mezcla "rRmY" y los aptámeros seleccionados de éstos son denominados como aptámeros "rRmY". Una mezcla de transcripción que contiene los desoxi A y G y los 2'-OMe U y C se denominan como una mezcla "dRmY" y los aptámeros seleccionados de éstos son

denominados como los aptámeros "dRmY". Una mezcla de transcripción que contiene 2'-OMe A, C y U, y 2'-OH G se denomina como una mezcla "rGmH" y los aptámeros seleccionados de éstos se denominan como aptámeros "rGmH". Una mezcla de transcripción contiene alternativamente 2'-OMe A, C, U y G y 2'-F G es denominada como una "mezcla alternativa" y los aptámeros seleccionados de éstos son denominados como aptámeros de "mezcla alternativa". Una mezcla de transcripción que contiene 2'-OMe A, U, C, y G, donde hasta el 10% de los G son ribonucleótidos se denominan como una mezcla "r/mGmH" y los aptámeros seleccionados de éstos se denominan como aptámeros "r/mGmH". Una mezcla de transcripción que contiene 2'-OMe A, U, y C, y 2'-F G se denomina como una mezcla "fGmH" y los aptámeros seleccionados de éstos son denominados como aptámeros "fGmH". Una mezcla de transcripción que contiene 2'-OMe A, U, y C, y desoxi G se denomina como una mezcla "dGmH" y los aptámeros seleccionados de éstos son denominados como los aptámeros "dGmH". Una mezcla de transcripción que contiene el desoxi A, y el 2'-OMe C, G y U se denomina como la mezcla "dAmB" y los aptámeros seleccionados de éstos se denominan como los aptámeros "dAmB", y la mezcla de transcripción que contiene todos los nucleótidos 2'-OH se denomina como la mezcla "rN" y los aptámeros seleccionados de éstos se denominan como los aptámeros "rN" o "rRrY". Un aptámero "mRmY" es uno que contiene todos los nucleótidos 2'-O-metilo y es usualmente derivado de los oligonucleótidos r/mGmH mediante reemplazo

post-SELEX™, cuando es posible, de cualquiera de los 2'-OH Gs con 2'-OMe Gs.

[00101] Una modalidad preferida incluye cualquier combinación de los nucleótidos 2'-OH, 2'-desoxi y 2'-OMe. Una modalidad más preferida incluye cualquier combinación de los nucleótidos 2'-desoxi y 2'-OMe. Una modalidad aún más preferida es con cualquier combinación de los nucleótidos 2'-desoxi y 2'-OMe en el cual las pirimidinas son 2'-OMe (tal como la dRmY, mRmY o dGmH).

[00102] La incorporación de los nucleótidos modificados en los aptámeros de la invención se logra antes del proceso (pre)de selección (por ejemplo, una modificación del proceso pre-SELEX™). Opcionalmente, los aptámeros de la invención en los cuales los nucleótidos modificados se han incorporado mediante la modificación del proceso pre-SELEX™ se puede modificar adicionalmente mediante la modificación del proceso post-SELEX™ (es decir, una modificación del proceso post-SELEX™ después de la modificación del pre-SELEX™). Las modificaciones del proceso pre-SELEX™ producen ligandos de ácido nucleico modificado con especificidad para el blanco SELEX™ y también estabilidad *in vivo* mejorada. Las modificaciones del proceso post-SELEX™, es decir, la modificación (por ejemplo, truncado, supresión, sustitución o modificaciones de nucleótido adicionales de los ligandos previamente identificados que tienen nucleótidos incorporados

mediante la modificación del proceso pre-SELEX™) puede resultar en una mejora adicional de la estabilidad *in vivo* sin afectar adversamente la capacidad de unión del ligando de ácido nucleico que tiene los nucleótidos incorporados mediante las modificaciones del proceso pre-SELEX™.

[00103] Para generar grupos de transcriptos de ARN 2'-modificados (por ejemplo, 2'-OMe) en condiciones bajo las cuales la polimerasa acepta los NTP 2'-modificados la polimerasa preferida es el mutante doble Y693F/H784A sobre el mutante simple Y693F. Otras polimerasas, particularmente aquellas que exhiben una alta tolerancia a los sustituyentes en masa 2', también se pueden utilizar en la presente invención. Tales polimerasas se pueden seleccionar por su capacidad para ensayar su habilidad para incorporar nucleótidos modificados bajo las condiciones de transcripción descritas aquí.

[00104] Un número de factores se ha determinado por ser importante para las condiciones de transcripción útiles en los métodos descritos aquí. Por ejemplo, incremento en la producción del transcripto modificado se observa cuando una secuencia líder se incorpora en el extremo 5' de la secuencia fija en el extremo 5' del molde de transcripción de ADN, de tal forma que al menos aproximadamente los primeros 6 residuos del transcripto resultante son todos purinas.

380

[00105] Otro factor importante para obtener los transcriptos que incorporan los nucleótidos modificados es la presencia de la concentración de 2'-OH GTP. La transcripción se puede dividir en dos fases: la primer fase es iniciación, durante la cual un NTP se agrega al extremo 3'-hidroxilo del GTP (u otra guanocina sustituida) para producir un di nucleótido que es luego extendido por aproximadamente 10-12 nucleótidos; la segunda fase es la elongación, durante la cual la transcripción procede más allá de la adición de los primeros 10-12 nucleótidos. Se ha encontrado que las cantidades pequeñas de 2'-OH GTP agregadas a mezcla de transcripción que contiene un exceso de 2'-OMe GTP son suficientes para posibilitarle a la polimerasa iniciar la transcripción utilizando 2'-OH GTP, pero una vez la transcripción ingresa a la fase de elongación la discriminación reducida entre el 2'-OMe y el 2'-OH GTP, y el exceso de 2'-OMe GTP sobre 2'-OH GTP le permite la incorporación de principalmente el 2'-OMe GTP.

[00106] Otro factor importante en la incorporación de los nucleótidos 2'-OMe sustituidos en los transcriptos es el uso de tanto magnesio como manganeso divalente en la mezcla de transcripción. Las diferentes combinaciones de las concentraciones de cloruro de magnesio y cloruro de manganeso se han encontrado que afectan los rendimientos de los transcriptos 2'-O-metilados, la concentración óptima del cloruro de magnesio y manganeso que es dependiente de la

concentración en la mezcla de reacción de transcripción de los NTP que hace complejo los iones de metal divalente. Para obtener el rendimiento más grande de los transcriptos O-metilados máximamente 2' sustituidos (es decir, todos los A, C, y U y aproximadamente el 90% de los nucleótidos G), la concentración de aproximadamente 5mM de cloruro de magnesio y 1.5 mM de cloruro de manganeso se prefiere cuando cada NTP esta presente a una concentración de 0.5 mM. Cuando la concentración en cada NTP es 1.0 mM, la concentración de aproximadamente 6.5 mM de cloruro de magnesio y 2.0 mM de cloruro de manganeso se prefieren. Cuando la concentración de cada NTP es 2.0 mM, las concentraciones de aproximadamente 9.6 mM de cloruro de magnesio y 2.9 mM de cloruro de manganeso se prefieren. En cualquier caso, apartarse de estas concentraciones por hasta dos veces da aún cantidades significativas de los transcriptos modificados.

[00107] La transcripción de iniciación con GMP o guanosina también es importante. Esta efectúa resultados de la especificidad de la polimerasa para el nucleótido iniciante. Como resultado, el nucleótido terminal 5' del trascripto generado de esta forma es probablemente 2'-OH G. La concentración preferida de GMP (o guanosina) es 0.5 mM y aún más preferiblemente 1 mM. También se ha encontrado que incluyendo el PEG, preferiblemente PEG-8000, en la reacción de transcripción es útil maximizar la incorporación de los nucleótidos modificados.

[00108] Para la incorporación máxima del 2'-OMe ATP (100%), UTP (100%),CTP (100%)y GTP (~90%)("r/mGmH")en los transcriptos se prefieren las siguientes condiciones: amortiguador HEPES 200 mM, DTT 40 mM, espermidina 2 mM, PEG-8000 10% (p/v), Triton X-100 0.01% (p/v) $MgCl_2$ 5 mM (6.5 mM donde la concentración de cada 2'-OMe NTP es 1.0 mM), $MnCl_2$ 1.5 mM (2.0 mM donde la concentración de cada 2'-OMe NTP es 1.0 mM), 2'-OMe NTP (cada uno) 500 µM (más preferiblemente, 1.0 mM), 2'-OH GTP 30 µM, 2'-OH GMP 500 µM, pH 7.5, ARN polimerasa Y639F/H784A T7 15 unidades/mL, pirofosfatazo inorgánico 5 unidades/mL, y toda la secuencia líder de purina de al menos 8 nucleótidos de largo. Como se utiliza aquí, una unidad de la polimerasa de ARN T7 mutante Y639F/H784A (o cualquier otra polimerasa de ARN T7 mutante especificada aquí) se define como la cantidad de encima requerida para incorporar 1 mmol de los NTP 2'-OMe en los transcriptos bajo las condiciones r/mGmH. Como se utiliza aquí, una unidad de la pirofosfataza inorgánica se definió como la cantidad de encima que liberará 1.0 moles de ortofosfato inorgánico por minuto a un pH 7.2 y 25°C.

[00109] Para la incorporación máxima (100%)de 2'-OMe ATP, UTP y CTP ("rGmH") en los transcriptos se prefieren las siguientes condiciones: amortiguador HEPES 200 mM, DTT 40 mM, espermidina 2 mM, PEG-8000 10% (p/v), Triton X-100 0.01% (p/v), $MgCl_2$ 5 mM (9.6 mM donde la concentración de cada 2'-

OMe NTP es 2.0 mM), $MnCl_2$ 1.5 mM (2.9 mM donde la concentración de cada 2'-OMe NTP es 2.0 mM), 2'-OMe NTP (cada uno) 500 µM (más preferiblemente, 2.0 mM), pH 7.5, ARN polimerasa Y639F T7 15 unidades/mL, pirofosfatazo inorgánico 5 unidades/mL, y una secuencia líder de todas las purinas de al menos 8 nucleótidos de largo.

[00110] Para la incorporación máxima (100%)de 2'-OMe UTP y CTP ("rRmY") en los transcriptos se prefieren las siguientes condiciones: amortiguador HEPES 200 mM, DTT 40 mM, espermidina 2 mM, PEG-8000 10% (p/v), Triton X-100 0.01% (p/v), $MgCl_2$ 5 mM (9.6 mM donde la concentración de cada 2'-OMe NTP es 2.0 mM), $MnCl_2$ 1.5 mM (2.9 mM donde la concentración de cada 2'-OMe NTP es 2.0 mM), 2'-OMe NTP (cada uno) 500 µM (más preferiblemente, 2.0 mM), pH 7.5, ARN polimerasa Y639F/H784A T7 15 unidades/mL, pirofosfatazo inorgánico 5 unidades/mL, y una secuencia líder de todas las purinas de al menos 8 nucleótidos de largo.

[00111] Para la incorporación máxima (100%)de desoxi ATP y GTP y 2'-OMe UTP y CTP("dRmY") en los transcriptos se prefieren las siguientes condiciones: amortiguador HEPES 200 mM, DTT 40 mM, espermina 2 mM, espermidina 2 mM, PEG-8000 10% (p/v), Triton X-100 0.01% (p/v), $MgCl_2$ 9.6 mM, $MnCl_2$ 2.9 mM, 2'-OMe NTP (cada uno) 2.0 mM, pH 7.5, ARN polimerasa Y639F T7 15 unidades/mL, pirofosfatazo inorgánico 5 unidades/mL, y

toda la secuencia líder de purina de al menos 8 nucleótidos de largo.

[00112] Para la incorporación máxima (100%) de 2'-OMe ATP, UTP y CTP y 2'-F GTP("fGmH") en los transcriptos se prefieren las siguientes condiciones: amortiguador HEPES 200 mM, DTT 40 mM, espermidina 2 mM, PEG-8000 10% (p/v), Triton X-100 0.01% (p/v), $MgCl_2$ 9.6 mM, $MnCl_2$ 2.9 mM, 2'-OMe NTP (cada uno) 2.0 mM, pH 7.5, ARN polimerasa Y639F T7 15 unidades/mL, pirofosfatazo inorgánico 5 unidades/mL, y toda la secuencia líder de purina de al menos 8 nucleótidos de largo.

[00113] Para la incorporación máxima (100%) de desoxi ATP y 2'-OMe UTP, GTP y CTP("dAmB") en los transcriptos se prefieren las siguientes condiciones: amortiguador HEPES 200 mM, DTT 40 mM, espermidina 2 mM, PEG-8000 10% (p/v), Triton X-100 0.01% (p/v), $MgCl_2$ 9.6 mM, $MnCl_2$ 2.9 mM, 2'-OMe NTP (cada uno) 2.0 mM, pH 7.5, ARN polimerasa Y639F T7 15 unidades/mL, pirofosfatazo inorgánico 5 unidades/mL, y toda la secuencia líder de purina de al menos 8 nucleótidos de largo.

[00114] Para cada una de las anteriores (a) la transcripción es preferiblemente desarrollada a una temperatura de desde aproximadamente 20°C a aproximadamente 50°C, preferiblemente desde aproximadamente 30°C a 45°C, y más preferiblemente a aproximadamente 37°C durante un período

de al menos dos horas (b) 50-300 nM de un molde de transcripción de ADN de doble hebra se utiliza (200 nM de molde se utiliza en la ronda 1 para incrementar la diversidad(300 nM de molde se utiliza en transcripciones dRmY)), y para las rondas subsecuentes se utiliza aproximadamente 50 nM, dilución 1/10 de una reacción PCR optimizada, utilizando las condiciones descritas aquí. Los moldes de transcripción de ADN preferidos son descritos adelante (en donde el ARC254 y ARC256 se transcriben bajo todas las condiciones 2'-OMe y el ARC255 se transcribe bajo las condiciones rRmY).

SEQ ID NO 1 (ARC254)
5'-
CATCGATGCTAGTCGTAACGATCCNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNCGAGAAC
GTTCTCTCCTCTCCCTATAGTGAGTCGTATTA-3'

SEQ IDNO 2 (ARC255)
5'-
CATGCATCGCGACTGACTAGCCGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGTAGAACG
TTCTCCTCTCCCTATAGTGAGTCGTATTA-3'
SEQ ID NO 3 (ARC256)
5'-
CATCGATCGATCGATCGACAGCGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGTAGAACG
TTCTCCTCTCCCTATAGTGAGTCGTATTA-3'

[00115] Bajo las condiciones de transcripción rN de la presente invención, la mezcla de reacción de la transcripción comprende 2'-OH adenoisin trifosfatos (ATP), 2'-OH guanosina trifosfatos (GTP), 2'-OH citidina trifosfatos (CTP), y 2'-OH uridina trifosfatos (UTP). Los oligonucleótidos modificados producidos utilizando las mezclas de transcripción rN de la presente invención comprenden sustancialmente todos 2'-OH adenosina, 2'-OH guanosina, 2'-OH citidina, y 2'-OH uridina.

En una modalidad preferida de la transcripción rN, los oligonucleótidos modificados resultantes comprenden una secuencia donde al menos el 80% de todos los nucleótidos adenosina son 2'-OH adenosina, al menos 80% de todos los nucleótidos guanosina son 2'-OH guanosina, al menos 80% de todos los nucleótidos citidina son 2'-OH citidina, y al menos 80% de todos los nucleótidos uridina son 2'-OH uridina. En una modalidad más preferida de la transcripción rN, los oligonucleótidos modificados resultantes de la presente invención comprenden una secuencia donde al menos el 90% de todos los nucleótidos adenosina son 2'-OH adenosina, al menos el 90% de todos los nucleótidos guanosina son 2'-OH guanosina, al menos el 90% de todos los nucleótidos citidina son 2'-OH citidina, y al menos el 90% de todos los nucleótidos uridina son 2'-OH uridina. En una modalidad más preferida de la transcripción rN, los oligonucleótidos modificados de la presente invención comprenden una secuencia donde el 100% de todos los nucleótidos adenosina son 2'-OH adenosina, 100% de todos los nucleótidos guanosina son 2'-OH guanosina, 100% de todos los nucleótidos citidina son 2'-OH citidina, y 100% de todos los nucleótidos uridina son 2'-OH uridina.

[00116] Bajo las condiciones de transcripción rRmY de la presente invención, la mezcla de reacción de la transcripción comprende 2'-OH adenoisin trifosfatos, 2'-OH guanosina trifosfatos, 2'-O-metil citidina trifosfatos, y 2'-O- metil

uridina trifosfatos. Los oligonucleótidos modificados producidos utilizando las mezclas de transcripción rRmY de la presente invención comprenden sustancialmente todos los 2'-OH adenosina, 2'-OH guanosina, 2'-O-metil citidina y 2'-O-metil uridina. En una modalidad preferida, los oligonucleótidos modificados resultantes comprenden una secuencia donde al menos el 80% de todos los nucleótidos adenosina son 2'-OH adenosina, al menos el 80% de todos los nucleótidos guanosina son 2'-OH guanosina, al menos el 80% de todos los nucleótidos citidina son 2'-O-metil citidina, y al menos 80% de todos los nucleótidos uridina son 2'-O- metil uridina. En una modalidad más preferida, los oligonucleótidos modificados resultantes comprenden una secuencia donde al menos el 90% de todos los nucleótidos adenosina son 2'-OH adenosina, al menos el 90% de todos los nucleótidos guanosina son 2'-OH guanosina, al menos el 90% de todos los nucleótidos citidina son 2'-O- metil citidina y al menos el 90% de todos los nucleótidos uridina son 2'-O- metil uridina. En una modalidad más preferida los oligonucleótidos modificados resultantes comprenden una secuencia donde el 100% de todos los nucleótidos adenosina son 2'-OH adenosina, 100% de todos los nucleótidos guanosina son 2'-OH guanosina, 100% de todos los nucleótidos citidina son 2'-O- metil citidina, y 100% de todos los nucleótidos uridina son 2'-O- metil uridina.

[00117] Bajo las condiciones de transcripción dRmY de la presente invención, la mezcla de reacción de transcripción

comprende 2'-desoxi adenoisin trifosfatos, 2'-desoxi guanosina trifosfatos, 2'-O-metil citidina trifosfatos, y 2'-O- metil uridina trifosfatos. Los oligonucleótidos modificados producidos utilizando las condiciones de transcripción dRmY de la presente invención comprenden sustancialmente todos los 2'-desoxi adenosina, 2'-desoxi guanosina, 2'-O-metil citidina y 2'-O-metil uridina. En una modalidad preferida, los oligonucleótidos modificados resultantes de la presente invención comprenden una secuencia donde al menos el 80% de todos los nucleótidos adenosina son 2'-desoxi adenosina, al menos 80% de todos los nucleótidos guanosina son 2'-desoxi guanosina, al menos 80% de todos los nucleótidos citidina son 2'-O-metil citidina, y al menos 80% de todos los nucleótidos uridina son 2'-O- metil uridina. En una modalidad más preferida, los oligonucleótidos modificados resultantes de la presente invención comprenden una secuencia donde al menos el 90% de todos los nucleótidos adenosina son 2'-desoxi adenosina, al menos 90% de todos los nucleótidos guanosina son 2'-desoxi guanosina, al menos 90% de todos los nucleótidos citidina son 2'-O- metil citidina y al menos 90% de todos los nucleótidos uridina son 2'-O- metil uridina. En una modalidad más preferida los oligonucleótidos modificados resultantes de la presente invención comprenden una secuencia donde el 100% de todos los nucleótidos adenosina son 2'-desoxi adenosina, 100% de todos los nucleótidos guanosina son 2'-desoxi guanosina, 100% de todos los nucleótidos citidina

son 2'-O- metil citidina, y 100% de todos los nucleótidos uridina son 2'-O- metil uridina.

[00118] Bajo las condiciones de transcripción rGmH de la presente invención, la mezcla de reacción de transcripción comprende 2'-OH guanosina trifosfatos, 2'-O-metil citidina trifosfatos, 2'-O-metil uridina trifosfatos, y 2'-O- metil adenosina trifosfatos. Los oligonucleótidos modificados producidos utilizando las mezclas de transcripción rGmH de la presente invención comprenden sustancialmente todos los 2'-OH guanosina, 2'-O-metil citidina, 2'-O-metil uridina y 2'-O-metil adenosina. En una modalidad preferida, los oligonucleótidos modificados resultantes comprenden una secuencia donde al menos el 80% de todos los nucleótidos guanosina son 2'-OH guanosina, al menos 80% de todos los nucleótidos citidina son 2'-O-metil citidina, al menos 80% de todos los nucleótidos uridina son 2'-O- metil uridina y al menos 80% de todos los nucleótidos adenosina son 2'-O-metil adenosina. En una modalidad más preferida, los oligonucleótidos modificados resultantes comprenden una secuencia donde al menos el 90% de todos los nucleótidos guanosina son 2'-OH guanosina, al menos 90% de todos los nucleótidos citidina son 2'-O- metil citidina, al menos 90% de todos los nucleótidos uridina son 2'-O- metil uridina, y al menos 90% de todos los nucleótidos adenosina son 2'-O-metil adenosina. En una modalidad más preferida, los oligonucleótidos modificados resultantes comprenden una

secuencia donde el 100% de todos los nucleótidos guanosina son 2'-OH guanosina, 100% de todos los nucleótidos citidina son 2'-O- metil citidina, 100% de todos los nucleótidos uridina son 2'-O- metil uridina, y 100% de todos los nucleótidos adenosina son 2'-O- metil adenosina.

[00119] Bajo las condiciones de transcripción r/mGmH de la presente invención, la mezcla de reacción de transcripción comprende 2'-O-metil adenosina trifosfato, 2'-O-metil citidina trifosfato, 2'-O-metil guanosina trifosfato, 2'-O-metil uridina trifosfato y 2'-OH guanosina trifosfato. Los oligonucleótidos modificados resultantes producidos utilizando las mezclas de transcripción r/mGmH de la presente invención comprenden sustancialmente todos los 2'-O-metil adenosina, 2'-O-metil citidina, 2'-O-metil guanosina y 2'-O-metil uridina. En donde la población de nucleótidos guanosina tiene un máximo de aproximadamente 10% de 2'-OH guanosina. En una modalidad preferida, los oligonucleótidos modificados r/mGmH resultantes de la presente invención comprenden una secuencia donde al menos el 80% de todos los nucleótidos adenosina son 2'-O-metil adenosina, al menos 80% de todos los nucleótidos citidina son 2'-O-metil citidina, al menos 80% de todos los nucleótidos guanosina son 2'-O- metil guanosina, al menos 80% de todos los nucleótidos uridina son 2'-O-metil uridina, y no más de aproximadamente el 10% de todos los nucleótidos guanosina son 2'-OH guanosina. En una modalidad más preferida, los oligonucleótidos modificados resultantes

391

comprenden una secuencia donde al menos el 90% de todos los nucleótidos adenosina son 2'-O- metil adenosina, al menos 90% de todos los nucleótidos citidina son 2'-O- metil citidina, al menos 90% de todos los nucleótidos guanosina son 2'-O- metil guanosina, al menos 90% de todos los nucleótidos uridina son 2'-O- metil uridina, y no más de aproximadamente el 10% de todos los nucleótidos guanosina son 2'-OH guanosina. En una modalidad más preferida, los oligonucleótidos modificados resultantes comprenden una secuencia donde el 100% de todos los nucleótidos adenosina son 2'-O-metil adenosina, 100% de todos los nucleótidos citidina son 2'-O- metil citidina, 90% de todos los nucleótidos guanosina son 2'-O- metil guanosina, y 100% de todos los nucleótidos uridina son 2'-O- metil uridina, y no más de aproximadamente el 10% de todos los nucleótidos guanosina son 2'-OH guanosina.

[00120] Bajo las condiciones de transcripción fGmH de la presente invención, la mezcla de reacción de transcripción comprende 2'-O-metil adenosina trifosfatos, 2'-O-metil uridina trifosfatos, 2'-O-metil citidina trifosfatos, y 2'-F guanosina trifosfatos. Los oligonucleótidos modificados producidos utilizando las condiciones de transcripción fGmH de la presente invención comprenden sustancialmente todos los 2'-O-metil adenosina, 2'-O-metil uridina, 2'-O-metil citidina y 2'-F guanosina. En una modalidad preferida, los oligonucleótidos modificados resultantes comprenden una

secuencia donde al menos el 80% de todos los nucleótidos adenosina son 2'-O-metil adenosina, al menos 80% de todos los nucleótidos uridina son 2'-O-metil uridina, al menos 80% de todos los nucleótidos citidina son 2'-O- metil citidina, y al menos 80% de todos los nucleótidos guanosina son 2'-F guanosina. En una modalidad más preferida, los oligonucleótidos modificados resultantes comprenden una secuencia donde al menos el 90% de todos los nucleótidos adenosina son 2'-O-metil adenosina, al menos 90% de todos los nucleótidos uridina son 2'-O- metil uridina, al menos 90% de todos los nucleótidos citidina son 2'-O- metil citidina, y al menos 90% de todos los nucleótidos guanosina son 2'-F guanosina. En una modalidad más preferida, los oligonucleótidos modificados resultantes comprenden una secuencia donde el 100% de todos los nucleótidos adenosina son 2'-O-metil adenosina, 100% de todos los nucleótidos uridina son 2'-O-metil uridina, 100% de todos los nucleótidos citidina son 2'-O- metil citidina, y 100% de todos los nucleótidos guanosina son 2'-F guanosina.

[00121] Bajo las condiciones de transcripción dAmB de la presente invención, la mezcla de reacción de transcripción comprende 2'-desoxi adenosin trifosfatos, 2'-O-metil citidina trifosfatos, 2'-O-metil guanosina trifosfatos, y 2'-O-metil uridina trifosfatos. Los oligonucleótidos modificados producidos utilizando las mezclas de transcripción dAmB de la presente invención comprenden sustancialmente todos los 2'-

desoxi adenosina, 2'-O-metil citidina, 2'-O-metil guanosina y 2'-O-metil uridina. En una modalidad preferida, los oligonucleótidos modificados resultantes comprenden una secuencia donde al menos el 80% de todos los nucleótidos adenosina son 2'-desoxi adenosina, al menos 80% de todos los nucleótidos citidina son 2'-O-metil citidina, al menos 80% de todos los nucleótidos guanosina son 2'-O- metil guanosina, y al menos 80% de todos los nucleótidos uridina son 2'-O-metil uridina. En una modalidad más preferida, los oligonucleótidos modificados resultantes comprenden una secuencia donde al menos el 90% de todos los nucleótidos adenosina son 2'-desoxi adenosina, al menos 90% de todos los nucleótidos citidina son 2'-O- metil citidina, al menos 90% de todos los nucleótidos guanosina son 2'-O- metil guanosina, y al menos 90% de todos los nucleótidos uridina son 2'-O-metil uridina. En una modalidad más preferida, los oligonucleótidos modificados resultantes de la presente invención comprenden una secuencia donde el 100% de todos los nucleótidos adenosina son 2'-desoxi adenosina, 100% de todos los nucleótidos citidina son 2'-O-metil citidina, 100% de todos los nucleótidos guanosina son 2'-O- metil guanosina, y 100% de todos los nucleótidos uridina son 2'-O-metil uridina.

[00122] En cada caso, los productos de transcripción se pueden utilizar como una librería en el proceso SELEX™ para identificar los aptámeros y/o para determinar un motivo conservado de secuencias que tenga la especificidad de unión

para un blanco dado. Las secuencias resultantes ya son parcialmente estabilizadas, eliminando esta etapa del proceso para llegar a una secuencia de aptámero optimizada y dar un aptámero más altamente estabilizado como resultado. Otra ventaja del proceso 2'-OMe SELEX™ es que las secuencias resultantes tienen probablemente más pocos 2'-OH nucleótidos requeridos en la secuencia, posiblemente ninguno. En la proporción en que los nucleótidos 2'OH permanezcan ellos se pueden remover al desarrollar modificaciónes post- SELEX™.

[00123] Como se describe adelante, rendimientos inferiores pero aún útiles de transcriptos incorporan completamente los nucleótidos 2' sustituidos se pueden obtener bajo condiciones diferentes de las condiciones optimizadas descritas anteriormente. Por ejemplo, las variaciones de las condiciones de transcripción anteriores incluyen:

[00124] La concentración de amortiguador HEPES puede variar desde 0 a 1 M. La presente invención también contempla el uso de otros agentes amortiguantes que tienen un pKa entre 5 y 10 incluyendo, por ejemplo, tris-hidroximetil-aminometano.

[00125] La concentración de DTT puede variar desde 0 a 400 mM. Los métodos de la presente invención también suministran el uso de otros agentes reductores incluyendo, por ejemplo, mercaptoetanol.

395

[00126] La concentración de espermidina y/o espermina puede variar desde 0 a 20 mM.

[00127] La concentración de PEG-8000 puede variar desde 0 a 50% (p/v). Los métodos de la presente invención también suministran el uso de otro polímero hidrofilico que incluyen, por ejemplo, otro PEG de peso molecular u otros polialquilen glicoles.

[00128] La concentración de Triton X-100 puede variar desde 0 a 0.1% (p/v). Los métodos de la presente invención también suministran el uso de otros detergentes no iónicos que incluyen, por ejemplo, otros detergentes, que incluyen otros detergentes Triton-X.

[00129] La concentración de $MgCl_2$ puede variar desde 0.5 mM a 50mM. La concentración $MnCl_2$ puede variar desde 0.15 mM a 15mM. Tanto el $MgCl_2$ como el $MnCl_2$ puede estar presente en los rangos descritos y en una modalidad preferida estar presentes en aproximadamente una proporción de 10 a aproximadamente 3 de $MgCl_2$: $MnCl_2$, preferiblemente, la proporción es aproximadamente 3-5:1, más preferiblemente, la proporción es aproximadamente 3-4:1.

[00130] La concentración de 2'-OMe NTP (cada NTP) puede variar desde 5 µM a 5 mM.

396

[00131] La concentración de 2'-OH GTP puede variar desde 0 µM a 300 µM.

[00132] La concentración de 2'-OH GMP puede variar desde 0 a 5 mM.

[00133] El pH puede variar desde pH 6 a pH 9. Los métodos de la presente invención se pueden practicar dentro de un rango de pH de actividad de las polimerasas que incorporan nucleótidos modificados. Además, los métodos de la presente invención suministran el uso óptimo de agentes quelantes en la condición de reacción de transcripción que incluyen, por ejemplo, EDTA, EGTA, y DTT.

ESTRATEGIAS DE SELECCIÓN DE APTÁMERO IL-23 Y/O IL-12

[00134] La presente invención suministra aptámeros que se unen al IL-23 y/o IL-12 de humano y en algunas modalidades, inhiben la unión a su receptor y/o de otra manera modulan su función. El IL-23 e IL-12 humanos son ambos heterodímeros que tienen una subunidad en común y una única. La subunidad en común es la subunidad p40 que contiene la siguiente secuencia de amino ácido (# de Acceso AF180563) (SEQ ID NO 4):

MCHQQLVISWFSLVFLASPLVAIWELKKDVYVVELDWYPDAPGE

MVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLL

LLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSR

397

GSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKL

KYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQ

VQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCS.

[0001] La subunidad p19 es única para IL-23 y contiene la siguiente secuencia de amino ácido (# de Acceso BC067511) (SEQ ID NO 5):

MLGSRAVMLLLLLPWTAQGRAVPGGSSPAWTQCQQLSQKLCTLA

WSAHPLVGHMDLREEGDEETTNDVPHIQCGDGCDPQGLRDNSQFCLQRIHQGLIFYE
K

LLGSDIFTGEPSLLPDSPVGQLHASLLGLSQLLQPEGHHWETQQIPSLSPSQPWQRLL

LRFKILRSLQAFVAVAARVFAHGAATLSP.

[00135] La subunidad p35 es única para el IL-12 y contiene la siguiente secuencia de amino ácido (# de Acceso AF180562) (SEQ ID NO 6):

MWPPGSASQPPPSPAAATGLHPAARPVSLQCRLSMCPARSLLLV

ATLVLLDHLSLARNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSE
E

IDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSS

IYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSS
LE

EPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS.

[00136] En la presente invención también se suministran aptámeros que se unen a IL-23 y/o IL-12 de ratón y en algunas modalidades, inhiben la unión a su receptor y/o modulan de

398

otra manera su función. Como los humanos, el IL-23 y el IL-12 de ratón son ambos heterodímeros que comparten la subunidad p40 de ratón, aunque la subunidad p19 de ratón es específica para el IL-23 de ratón y la subunidad p35 de ratón es única para el IL-12 de ratón. La subunidad p40 de ratón contiene la siguiente secuencia de amino ácido (# de Acceso P43432) (SEQ ID NO 315):

MCPQKLTISWFAIVLLVSPLMAMWELEKDVYVVEVDWTPDAPGETVNLTCDTPEED
DITWTSDQRHGVIGSGKTLTITVKEFLDAGQYTCHKGGETLSHSHLLLHKKENGIWS
TEILKNFKNKTFLKCEAPNYSGRFTCSWLVQRNMDLKFNIKSSSSSPDSRAVTCGMA
SLSAEKVTLDQRDYEKYSVSCQEDVTCPTAEETLPIELALEARQQNKYENYSTSFFIR
DIIKPDPPKNLQMKPLKNSQVEVSWEYPDSWSTPHSYFSLKFFVRIQRKKEKMKETE
EGCNQKGAFLVEKTSTEVQCKGGNVCVQAQDRYYNSSCSKWACVPCRVRS

[00137] La subunidad p19 de ratón contiene la siguiente secuencia de amino ácido (# de Acceso NP112542) (SEQ ID NO 316):

MLDCRAVIMLWLLPWVTQGLAVPRSSSPDWAQCQQLSRNLCMLAWNAHAP
AGHMNLLREEEDEETKNNVPRIQCEDGCDPQGLKDNSQFCLQRIRQGLAF
YKHLLDSDIF KGEPALLPDSPMEQLHTSLLGLSQLLQPEDHPRETQQMPS
LSSSQQWQRPLLRSKILRSLQAFLAIAARVFAHGAATLTE PLVPTA.

[00138] La subunidad p35 de ratón contiene la siguiente secuencia de amino ácido (# de Acceso P43431) (SEQ ID NO 317):

399

MCQSRYLLFLATLALLNHLSLARVIPVSGPARCLSQSRNLLKTTDDMVKTAREKLKH
YSCTAEDIDHEDITRDQTSTLKTCLPLELHKNESCLATRETSSTTRGSCLPPQKTSLM
MTLCL

GSIYEDLKMYQTEFQAINAALQNHNHQQIILDKGMLVAIDELMQSLNHNGETLRQKP
PVGEADPYRVKMKLCILLHAFST RVVTINRVMG YLSSA

[00139] Se pueden emplear varias estrategias SELEX™ para generar aptámeros con una variedad de especificidades para el IL-23 y el IL-12. Un esquema produce aptámeros específicos para IL-23 sobre IL-12 al incluir el IL-12 en una etapa de selección negativa. Esta elimina las secuencias que reconoce la subunidad común, p40 (SEQ ID NO 4), y selecciona los aptámeros específicos para el IL-23, o la subunidad p19 (SEQ ID NO 5) como se muestra en la Figura 3. Un esquema produce aptámeros específicos para IL-12 sobre IL-23 al incluir el IL-23 en la etapa de selección negativa. Esta elimina las secuencias que reconoce la subunidad común, p40 (SEQ ID NO 4) y selecciona los aptámeros específicos para el IL-12, o la subunidad p35 (SEQ ID NO 6). Una selección separada en la cual el IL-23 y el IL-12 son alternados cada tercer ronda elicitan aptámeros que reconocen la subunidad común, p40 (SEQ ID NO 4), y por lo tanto reconocen ambas proteínas. Una vez se encuentran las secuencias con la especificidad de unión deseada, la minimización de aquellas secuencias se puede tomar para reducir sistemáticamente el tamaño de las secuencias con la mejora concomitante en las características de unión.

400

[00140] Los aptámeros seleccionados que tienen la afinidad más alta y la unión específica como se demostró mediante ensayos biológicos como se describió en los ejemplos de adelante son terapéuticos adecuados para tratar condiciones en las cuales el IL-23 y/o IL-12 están involucrados en patogénesis.

APTÁMEROS DE UNIÓN ESPECÍFICOS DE IL-23 Y/O IL-12

[00141] Los materiales de la presente invención comprenden una serie de aptámeros de ácido nucleico de ~25-90 nucleótidos de longitud que se unen específicamente a las citoquinas de la familia de citoquina IL-12 de humano que incluye IL-12, IL-23, e IL-27; monómeros de subunidad p19, p35, y p40; y dímeros de subunidad p40, y que funcionalmente modulan, por ejemplo, bloque, la actividad del IL-23 y/o IL-12 en *in vivo* y/o los ensayos basados en célula.

[00142] Los aptámeros específicamente capaces de unirse y modular el IL-23 y/o el IL-12 se establecen aquí. Estos aptámeros suministran una baja toxicidad, seguridad, y una modalidad efectiva de tratar y/o prevenir enfermedades o desordenes relacionadas con auto inmunidad e inflamatorias. En una modalidad, los aptámeros de la invención son utilizados para tratar y/o prevenir enfermedades inflamatorias y auto inmunes, que incluyen pero no están limitadas a, esclerosis múltiple, artritis reumatoide,

soriasis vulgaris, y enfermedad irritable del intestino, que incluyen sin limitación enfermedad de Crohn, y colitis ulcerativa, cada una de las cuales son conocidas por originar o estar asociadas de otra forma con la citoquina IL-23 y/o IL-12. En otra modalidad, los aptámeros de la invención son utilizados para tratar y/o prevenir la diabetes tipo I, que es conocida por causar o esta asociada de otra forma con la citoquina IL-23 y/o IL-12. En otra modalidad, los aptámeros de la invención son utilizados para tratar y/o prevenir otras indicaciones para la cual la activación del receptor de citoquina que se une es deseable incluyendo, por ejemplo, lupus sistémico eritematoso, cáncer de colon, cáncer de pulmón, y reabsorción del hueso en osteoporosis.

[00143] Los ejemplos de aptámeros de unión específicos de IL-23 y/o IL-12 para uso como terapéuticos y/o diagnósticos incluyen las siguientes listas de secuencias adelante.

[00144] A menos que se anote otra cosa, ARC489 (SEQ ID NO 91), ARC491 (SEQ ID NO 94), ARC621 (SEQ ID NO 108), ARC627 (SEQ ID NO 110), ARC527 (SEQ ID NO 159), ARC792 (SEQ ID NO 162), ARC794 (SEQ ID NO 164),ARC795 (SEQ ID NO 165), ARC979 (SEQ ID NO 177), ARC1386 (SEQ ID NO 224), y ARC1623-ARC1625 (SEQ ID NO 309-311) representan las secuencias de aptámeros que se unen al IL-23 y/o IL-12 que fueron seleccionados bajo condiciones SELEX™ en las cuales las purinas (A y G) son desoxi, y las pirimidinas (C y U) son 2'-OMe.

[00145] La región de secuencia única del ARC489 (SEQ ID NO 91) y ARC491 (SEQ ID NO 94) inician en el nucleótido 23, inmediatamente luego de la secuencia GGGAGAGGAGAGAACGUUCUAC SEQ UD NO 69), y corre hasta que éste encuentra la secuencia de ácido nucleico fija 3' GCUGUCGAUCGAUCGAUCGAUG (SEQ ID NO 90).

[00146] La región de secuencia única del ARC621 (SEQ ID NO 108) y ARC627 (SEQ ID NO 110) inician en el nucleótido 23, inmediatamente luego de la secuencia GGGAGAGGAGAGAACGUUCUAC SEQ UD NO 101), y corre hasta que encuentra la secuencia de ácido nucleico fija 3' GUCGAUCGAUCGAUCAUCGAUG (SEQ ID NO 102).

403

SEQ ID NO 91 (ARC489)
GGGAGAGGAGAGAACGUUCUACAGCCCCCGGUGGGCGGGCAUUGGGUGGAUGCGCUGUCGAUCGAUCGAUCGAUG

SEQ ID NO 94 (ARC491)
GGGAGAGGAGAGAACGUUCUACAGCCCCCGUGGGUGGGCAUUAGGGUGGAUGCGCUGUCGAUCGAUCGAUCGAUG

SEQ ID NO 108 (ARC621)
GGGAGAGGAGAGAACGUUCUACAGGCGGUUACGGGGGAUGCGGGUGGGACAGGUCGAUCGAUCGAUCAUCGAUG

SEQ ID NO 110 (ARC627)
GGGAGAGGAGAGAACGUUCUACAGGCAAGUAAUUGGGGAGUGCGGGCGGGGUGUCGAUCGAUCGAUCAUCGAUG

SEQ ID NO 159 (ARC527)
ACAGCGCCGGUGGGCGGGCAUUGGGUGGAUGCGCUGU

SEQ ID NO 162 (ARC792)
GGCAAGUAAUUGGGGAGUGCGGGCGGGG

SEQ ID NO 164 (ARC794)
GGCGGUACGGGGAGUGUGGGUUCGGGCCGG

SEQ ID NO 165 (ARC795)
CGAUAUAGGCGGUACGGGGGGAGUGGGCUGGGGUCG

SEQ ID NO 177 (ARC979)
ACAGGCAAGUAAUUGGGGAGUGCGGGCGGGGUGU

[00147] ARC1623 (SEQ ID NO 309), ARC1624 (SEQ ID NO 310) y ARC1625 (SEQ ID NO 311) representan secuencias optimizadas basadas en el ARC979 (SEQ ID NO 177), donde "d" representa desoxi, "m" representa 2' -O metilo, "s" indica un enlace de fosforotioato internucleótido "3T representa un desoxi timidita invertida 3'.

SEQ ID NO 309 (ARC1623)

dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGmGmG-s-dG-s-dA-s-dGmU-s-dGmCmGmGdGmCdGdGmGmGmUdGmU-3T

SEQ ID NO 310 (ARC1624)

dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGmGmGdGdAdGmUdGmCmGmG-s-dGmC-s-dG-s-dGmGmGmUdGmU-3T

SEQ ID NO 311 (ARC1625)

dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGmGmGdGdAdGmUdGmCmGmGdGmCdGdGmGmGmU-s-dGmU-3T

404

[00148] La SEQ ID NO 139-140, SEQ ID NO 144-145, SEQ ID NO 147, y SEQ ID NO 151-152, representan las secuencias de los aptámeros que se unen a IL-23 Y/O IL-12 que fueron seleccionadas bajo las condiciones SELEX™ en las cuales las purinas (A y G) son 2'-OH (ribo) y las pirimidinas (C y Y) son 2'-flúor.

SEQ ID NO 139 (A10.min5)
GGAGCAUACACAAGAAGUUUUUUGUGCUCUGAGUACUCAGCGUCCGUAAGGGAUAUGCUCC

SEQ ID NO 140 (A10.min6)
GGAGUACGCCGAAAGGCGCUCUGAGUACUCAGCGUCCGUAAGGGAUACUCC

SEQ ID NO 144 (B10.min4)
GGAGCAUACACAAGAAGUGCUUCAUGCGGCAAACUGCAUGACGUCGAAUAGAUAUGCUCC

SEQ ID NO 145 (B10.min5)
GGAGUACACAAGAAGUGCUUCCGAAAGGACGUCGAAUAGAUACUCC

SEQ ID NO 147 (F11.min2)
GGACAUACACAAGAUGUGCUUGAGUUAAAUCUCAUCGGUCCCCGUUUGGGGAUAUGUC

SEQ ID NO 151
GGGUACGCCGAAAGGCGCUUCCGAAAGGACGUCCGUAAGGGAUACCC

SEQ ID NO 152
GGAGUACGCCGAAAGGCGCUUCCGAAAGGACGUCCGUAAGGGAUACUCC

[00149] Otros aptámeros que se unen al IL-23 y/o IL-12 son descritos adelante en los ejemplos 1-3.

[00150] Estos aptámeros pueden incluir modificaciones como se describieron aquí que incluyen por ejemplo la conjugación a compuestos lipofílicos o de alto peso molecular (por ejemplo PEG), incorporación de un motivo

405

CpG, incorporación de una porción de casquete, la incorporación de nucleótidos modificados, la incorporación de fosforotioato en la estructura fosfato.

[00151] En una modalidad, el aptámero de ocurrencia no natural aislado que se une al IL-23 y/o IL-12 se suministra. En algunas modalidades, el aptámero de ocurrencia no naturalizado tiene una constante de disociación ("Kp") para el IL-23 y/o IL-12 de menos de 100 µM, menos de 1 µM , menos de 100 n,, menos de 100 nM, menos de 50 nM, menos de 1 nM, menos de 500 pM, menos de 100 pM y menos de 50 pM. En algunas modalidades de la invención, la constante de disociación se determina por la titulación de dot blot como se describe en el Ejemplo 1 adelante.

[00152] En otra modalidad, el aptámero de la invención modula una función de IL-23 y/o IL-12. En otra modalidad, el aptámero de la invención inhibe una función IL-23 y/o IL-12 mientras que en otra modalidad el aptámero estimula una función del blanco. En otra modalidad de la invención, el aptámero se une, y/o modula una variante IL-23 o IL-12. Una variante IL-23 o IL-12 como se utilizan aquí comprenden variantes que desarrollan esencialmente la misma función que una función µM, preferiblemente comprende sustancialmente la misma estructura y en algunas modalidades comprenden al menos 70% de identidad de secuencia, preferiblemente al menos 80% de identidad de secuencia, más preferiblemente al menos 90%

de identidad de secuencia, y más preferiblemente al menos 95% de identidad de secuencia con secuencia de aminoácido de IL-23 o IL-12. En algunas modalidades de la invención, la identidad de secuencia de las variantes blanco se determina utilizando BLAST como se describe adelante.

[00153] Los términos "identidad de secuencia" en el contexto de 2 o más ácidos nucleicos o secuencias de proteína, se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales o que tienen un porcentaje especifico de residuos de aminoácido o nucleótidos que son iguales, cuando se comparan y se alinean para correspondencia máxima, como se miden utilizando uno de los siguientes algoritmos de comparación de secuencia o mediante inspección visual. Para la comparación de secuencia, típicamente, la secuencia actúa como una secuencia de referencia con la cual se comparan las secuencias de ensayo. Cuando se utiliza una secuencia como algoritmo de comparación, las secuencias de ensayo y de referencia son ingresadas en una computadora, los coordinados de subsecuencia son designados si es necesario, y los parámetros de los programas de algoritmo de secuencia se designan. El algoritmo de comparación de secuencia calcula entonces la identidad de secuencia porcentual para el o las secuencias de ensayo con relación a la secuencia de referencia, con base en los parámetros de programa designados. El alineamiento óptimo de la secuencia para la comparación puede ser conducido por ejemplo, por un algoritmo

de homología local de Smith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2: 482 (1981), el algoritmo de homología local de Needleeman & Wunsch, J Mol. Biol. 48: 433 (1970, mediante la búsqueda del método de similaridad de Pearson & Lipman, Proc, Nat'l. Acad. Sci. USA 8: 2444 (1988), mediante implementaciones computarizadas d estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, y TFASTA en Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr. Madison, Wis.), o mediante inspección visual (ver de manera general, Ausubel *et al. infra*).

[00154] Un ejemplo de un algoritmo que es adecuado para determinar la identidad de secuencia porcentual es el algoritmo utilizado en la herramienta de búsqueda del alineamiento local básico (en lo sucesivo "BLAST"), ver, por ejemplo, Altschul *et al.*, J Mol. Biol. 403-410 (1990) y Altschul *et al.*, Nucleic Acids Res. 15: 3389-3402 (1997). El software para desarrollar el análisis BLAST está públicamente disponible a través del Nacional Center for Biotechnology Information (en los sucesivo "NCBI"). Loa parámetros por defecto utilizados para determinar la identidad de secuencia que utilizan el software disponible del NCBI, por ejemplo, BLASTN (para las secuencias de nucleótido) y BLASTP (para las secuencias de aminoácido) se describen en McGinnis *et al.*, Nucleic Acids Res. 32: W20-W25 (2004).

[00155] En una modalidad de la invención, el aptámero tiene sustancialmente la misma capacidad de unirse al IL-23 que aquella del aptámero que comprende cualquiera una de la SEQ ID NO 13-66, SEQ ID NOS 71-88, SEQ ID NOS 91-96, SEQ ID NOS103-118, SEQ ID NOS 124-134, SEQ ID NOS 135-159, SEQ ID NO 162 y SEQ ID NOS 164-172, SEQ ID NOS 176-178, SEQ ID NOS 181-196, y SEQ ID NOS 199-314. En otra modalidad de la invención el aptámero tiene sustancialmente la misma estructura y la capacidad de unirse al IL-23 que aquella de un aptámero que comprende una cualquiera de la SEQ ID NO 13-66, SEQ ID NOS 71-88, SEQ ID NOS 91-96, SEQ ID NOS 103-118, SEQ ID NOS 124-134, SEQ ID NOS 135-159, SEQ ID NO 162 y SEQ ID NOS 164-172, SEQ ID NOS 176-178, SEQ ID NOS 181-196, y SEQ ID NOS 199-314

[00156] En una modalidad de la invención el aptámero tiene sustancialmente la misma capacidad de unirse al IL-23 y/o I-12 o aquella de un aptámero que comprende una cualquiera de la SEQ ID NO 14, SEQ ID NOS 17-19, SEQ ID NO 21, SEQ ID NOS 27-32, SEQ ID NOS 34-40, SEQ ID NO 42, SEQ ID NO 49, SEQ ID NOS 60-61, SEQ ID NOS 91-92, SEQ ID NO 94, y SEQ ID NOS 103-118. En otra modalidad de la invención, el aptámero tiene sustancialmente la misma estructura y capacidad de unirse al IL-23 y/o IL-12, de un aptámero que comprende una cualquiera de la SEQ ID NO 14, SEQ ID NOS 17-19, SEQ ID NO 21, SEQ ID NOS 27-32, SEQ ID NOS 34-40, SEQ ID NO 42, SEQ ID NO 49, SEQ

ID NOS 60-61, SEQ ID NOS 91-92, SEQ ID NO 94, y SEQ ID NOS 103-118.

[00157] En otra modalidad, los aptámeros de la invención son utilizados como un ingrediente activo en las composiciones farmacéuticas. En otra modalidad, los aptámeros de las composiciones que comprenden los aptámeros de la invención son utilizados para tratar enfermedades inflamatorias y auto inmunes (que incluyen pero no están limitadas a esclerosis múltiple, artritis reumatoide, soriasis vulgaris, lupus eritematosus sistémico, y enfermedad irritable del intestino, que incluyen sin limitación enfermedad de Crhon, colitis y colitis ulcerativa), la diabetes Tipo I, el cáncer de colon el cáncer de pulmón, y la reabsorción de hueso en la osteoporosis.

[00158] En algunas modalidades las terapias de aptámero de la presente invención tienen gran afinidad y especificidad con sus blancos aunque reduciendo sus efectos colaterales deletéreos de las sustituciones de nucleótido de ocurrencia no natural si las terapias de aptámero se rompen en el cuerpo de los pacientes o sujetos. En algunas modalidades, las composiciones terapéuticas que contienen las terapias de aptámero de la presente invención son libres o tienen una cantidad reducida de nucleótidos fluorinados.

[00159] Los aptámeros de la presente invención se pueden sintetizar utilizando cualquiera de las técnicas de síntesis de oligonucleótido conocidas en la técnica que incluyen técnicas de síntesis de oligonucleótido de fase sólida (ver, por ejemplo, Froehler *et al.*, Nucl. Acid Res. 14: 5399-5467 (1986) y Froehler *et al.*, Tet. Lett. 27: 5575-5578 (1986)) y ver,por ejemplo, Sood et al., Nucl. Acid Res. 4: 2557 (1997) y Hirose *et al.*, Tet. Lett. 28: 2449 (1978)).

LOS APTÁMEROS QUE TIENEN MOTIVOS INMUNOESTIMULATORIOS

[00160] La presente invención suministra aptámeros que se unen al OL-23 y/o IL-12 y modulan su función biológica. Más específicamente, la presente invención suministra los aptámeros que incrementan la unión del IL-23 y/o IL-12 al receptor IL-23 y/o IL-12 mejorando de esta manera la función biológica del IL-23 y/o IL-12. El efecto agonístico de tales aptámeros se pueden mejorar adicionalmente al seleccionar los aptámeros que se unen al IL-23 y/o IL-12 y contienen motivos inmunoestimulatorios, o al tratar con aptámeros que se unen al IL-23 y/o IL-12 en conjunto con los aptámeros para un blanco conocido para unirse a las secu4ncias inmunoestimulatorias.

[00161] El reconocimiento del ADN bacterial mediante el sistema inmune de vertebrados se basa en el reconocimiento de los dinucleótidos CG no metilados en los contextos de

secuencia particular ("motivos CpG"). Un receptor que reconoce tales motivos es el receptor 9 similar a Toll ("TLR 9"), un miembro de la familia de los receptores similares a Toll (~ 10 miembros) que participan en la respuesta inmune innata al reconocer los componentes microbianos distintos. El TLR 9 se une a la secuencia CpG del oligodesoxinucleótido no metilado ("ODN") de una manera específica de secuencia. El reconocimiento de los motivos CpG dispara el mecanismo de defensa que conduce a respuestas inmunes innatas o últimamente adquiridas. Por ejemplo, la activación de TLR 9 en ratone induce la activación de células que presentan antígeno, sobre regulación de las moléculas MHC Clase I y II y la expresión de moléculas co-estimulatorias importantes y citoquinas que incluyen IL-12 e IL-23. Esta activación mejora tanto directa como indirectamente las respuestas de célula de las células B y T incluyendo sobre regulación robusta de la citoquina TH1 IFN-gama. Colectivamente, la respuesta a las secuencias CpG conducen a: protección contra enfermedades infecciosas, respuesta inmune mejorada a las vacunas, una respuesta efectiva contra el asma, y una citotoxicidad mediada por célula dependiente de anticuerpo mejorada. Así, los CpG ODN pueden suministrar protección contra las enfermedades infecciosas, funcionan como un inmuno adyuvantes o terapias para el cáncer (monoterapia o en combinación con el mAb u otras terapias), y pueden disminuir el asma y la respuesta alérgica.

[00162] Los aptámeros de la presente invención comprenden una o más CpG u otras secuencias inmuno estimulatorias se pueden identificar o generar mediante una variedad de estrategias utilizando, por ejemplo, el proceso SELEX™ descrito aquí, Las secuencias inmuno estimulatorias incorporadas pueden ser ADN, ARN, y/o una combinación de ADN/ARN. En general las estrategias se pueden dividir en dos grupos. En el grupo uno, las estrategias están dirigidas a identificar o a generar los aptámeros que comprenden tanto el motivo CpG u otra secuencia inmuno estimulatoria así como también el sitio de unión para un blanco, donde el blanco (en lo sucesivo "blanco no CpG") es un blanco diferente de uno conocido por reconocer los motivos CpG u otras secuencias inmuno estimulatorias y conocidas por estimular la respuesta inmune luego de unirse a un motivo CpG. En algunas modalidades de la invención el blanco no CpG es un blanco IL-23 y/o IL-12. La primera estrategia de este grupo comprende desarrollar SELEX™ para obtener un aptámero a un blanco no CpG especifico, preferiblemente un blanco, por ejemplo, Il-23 y/o IL-12, en donde la respuesta inmune represada es revelante al desarrollo de la enfermedad, utilizando un grupo de oligonucleótido en donde un motivo CpG se ha incorporado en 3' fija, por ejemplo, en algunas modalidades la región aleatorizada de los miembros de grupo comprenden una región fija que tiene un motivo CpG incorporado aquí, y que identifica un aptámero que comprende el motivo CpG. La segunda estrategia de éste grupo comprende desarrollar SELEX™

para obtener un aptámero a un blanco no CpG especifico, preferiblemente un blanco, por ejemplo IL-23 y/o IL-12, donde la respuesta inmune represada es revelante al desarrollo de la enfermedad, y luego de la selección que termina en un motivo CpG en el extremo 5' y/o 3' o trabajado por ingeniería un motivo CpG en una región, preferiblemente una región no esencial, del aptámero. La tercera estrategia de este grupo comprende desarrollar SELEXTM para obtener un aptámero a un blanco no-CpG específico, preferiblemente un blanco, por ejemplo IL-23 y/o IL-12, donde una respuesta inmune represada es relevante para el desarrollo de la enfermedad, en donde durante la síntesis del grupo la proporción molar de varios nucleótidos es presionada en una o más etapas de adición de nucleótido de tal forma que la región aleatorizada de cada miembro del grupo es enriquecida en los motivos CpG, e identificando un aptámero que comprende un motivo CpG. La cuarta estrategia de este grupo comprende desarrollar SELEX™ para obtener un aptámero a un blanco no CpG específico, preferiblemente un blanco, por ejemplo, Il-23 y/o IL-12, donde la respuesta inmune represada es revelante al desarrollo de la enfermedad, e identificando un aptámero que comprende un motivo CpG. La quinta estrategia de este grupo comprende desarrollar SELEX™ para obtener un aptámero a un blanco no-CpG específico, Preferiblemente un blanco, por ejemplo, IL-23 y/o IL-12, donde la respuesta inmune represada es revelante al desarrollo de la enfermedad, a identificar un

aptámero el cual, luego de unión, estimula una respuesta inmune pero que no comprende un motivo CpG.

[00163] En el grupo dos, las estrategias están dirigidas a identificar o a generar aptámeros que comprenden un motivo CpG y/o otras secuencias que se unen mediante los receptores para los motivos CpG (por ejemplo TLR9 u otros sectores similares a Toll) y luego estimular la unión de una respuesta inmune. La primera estrategia de este grupo comprende desarrollar SELEX™ para obtener un aptámero a un blanco conocido para unirse a los motivos CpG u otras secuencias inmunoestimulatorias y luego estimular por unión una respuesta inmune que utiliza un grupo de oligonucleótido en donde el motivo CpG se ha incorporado en cada miembro del grupo como parte de, una región fija, por ejemplo, en algunas modalidades la región aleatorizada de los miembros del grupo comprenden una región fija que tiene un motivo CpG incorporado allí. E identificando una aptámero que comprende un motivo CpG. La segunda estrategia de este grupo comprende desarrollar SELEX™ para obtener un aptámero a un blanco conocido por unirse a los motivos CpG u otras secuencias inmunoestimulatorias y luego estimular la unión de una respuesta inmune y luego terminar en un motivo CpG en el extremo 5′ y/o 3′ o trabajar por ingeniería un motivo CpG en una región, preferiblemente una región no esencial, del aptámero. La tercera estrategia de este grupo comprende desarrollar SELEXTM para obtener un aptámero o un banco

conocido para unir los motivos CpG u otras secuencias inmunoestimulatorias y luego estimular la unión de una respuesta inmune en donde durante la síntesis de grupo, la proporción molar de varios nucleótidos es presionada en una o más etapas de adición de nucleótidos en tal forma que la región aleatorizada de cada miembro de grupo se enriquece en los motivos CpG, e identificando un aptámero que comprende un motivo CpG. La cuarta estrategia de este grupo comprende desarrollar SELEX™ para obtener un aptámero a un blanco conocido para unir los motivos CpG u otras secuencias inmunoestimulatorias y luego estimular por unión una respuesta inmune identificar un aptámero que comprende un motivo CpG. La quinta estrategia de este grupo comprende desarrollar SELEXTM para obtener un aptámero a un blanco conocido para unir los motivos CpG u otras secuencias inmunoestimulatorias, identificar un aptámero el cual luego de la unión, estimula una respuesta inmune pero que no comprende un motivo CpG.

[00164] Una variedad de diferentes clases de motivos CpG se ha identificado, cada una resultando luego del reconocimiento en una cascada diferentes de eventos, liberación de citoquinas u otras moléculas, y activación de ciertos tipos de célula. Los motivos CpG en ADN Bacterial y sus efectos inmunes, ver, por ejemplo, Annu. Rev. Immunol.2002, 20: 709-760, incorporada aquí como referencia. Adicionalmente los motivos inmunoestimulatorios se describen en las siguientes

Patentes U.S, cada una es incorporada aquí como referencia. La Patente U.S. No. 6,207,646,; La Patente U.S No.6,239,116; La Patente U.S. No. 6,429,199; la Patente U.S. No. 6,214,806; la Patente U.S. No. 6,653,292; la Patente U.S. No. 6,426,434; la Patente U.S. No. 6,514,948 y la Patente U.S. No. 6,498,148. Cualquiera de estas CpG u otros motivos inmunoestimulatorios se pueden incorporar en un aptámero. La escogencia de los aptámeros es dependiente de la enfermedad o desorden a ser tratado. Los motivos inmunoestimulatorios preferidos son como sigue (mostrados de 5′ a 3′ de izquierda a derecha) en donde "r" designa una purina, "y" designa una pirimidina, y "x" designa cualquier nucleótido: AACGTTCGAG (SEQ ID 7); AACGTT; ACGT; rCGyy, rCGy, rrCGyy, XCGX, XXCGXX, y $X_1X_2CGY_1Y_2$ en donde X_1 es G o A, X_2 no es C, Y_1 no es G y Y_2 es preferiblemente T.

[00165] En aquellos casos donde un motivo CpG se incorpora en un aptámero que se une a un blanco específico diferente de un blanco conocido por unirse a los motivos CpG y luego de estimular por unión una respuesta inmune (un "blanco no CpG"), el CpG es preferiblemente localizado en una región no esencial del aptámero. Las regiones no esenciales de los aptámeros se pueden identificar mediante mutagenésis dirigida de sitio, análisis de supresión y/o análisis de sustitución. Sin embargo, cualquier localización que no interfiera significativamente con la capacidad del aptámero para unirse al blanco no CpG se puede utilizar. Además de estar embebido

dentro de la secuencia de aptámero, el motivo CpG se puede terminar en cualquiera o ambos de los estemos 5' y 3' o unir de otra forma al aptámero. Cualquier localización o medios de unión se pueden utilizar en tanto que la capacidad del aptámero para unirse al blanco no CpG no interfiere significativamente.

[00166] Como se utiliza aquí, "estimulación de la respuesta inmune" puede significar (1) la inducción de una respuesta específica (por ejemplo, inducción de una respuesta Th1) o de la producción de ciertas moléculas o (2) de inhibición o supresión de una respuesta especifica (por ejemplo, inhibición o supresión de la respuesta Th2) de o de ciertas moléculas.

COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS

[00167] La invención también incluye composiciones farmacéuticas que contienen moléculas de aptámero que se unen al IL-23 y/o IL-12. En algunas modalidades, las composiciones son adecuadas para uso interno e incluyen una cantidad efectiva de un compuesto farmacológicamente activo de la invención, solo o en combinación, con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables. Los compuestos son especialmente útiles por que ellos tienen muy baja si es que alguna toxicidad.

[00168] Las composiciones de la invención se pueden utilizar para tratar o prevenir una patología, tal como una enfermedad o desorden, o aliviar los síntomas de tal enfermedad o desorden en un paciente. Por ejemplo, las composiciones de la presente invención se pueden utilizar para tratar o prevenir una patología asociada con las citoquinas IL-23 y/o IL-12, que incluyen enfermedades relacionadas con inflamaciones y autoinmunes, diabetes Tipo I, reabsorción de hueso en la osteoporosis y cáncer.

[00169] Las composiciones de la invención son útiles para la administración a un sujeto que sufre de, o está predispuesto a, una enfermedad o desorden que está relacionado o que se deriva de un blanco al cual se pueden unir específicamente los aptámeros de la invención. Las composiciones de la invención se pueden utilizar en un método para tratar un paciente o sujeto que tiene una patología. El método involucra administrar al paciente objeto un aptámero de una composición que comprende los aptámeros que se unen al IL-23 y/o IL-12, involucrados con la patología, de tal forma que la unión de lactamero a IL-23 y/o IL-12 alteran la función biológica del blanco, tratando de esta manera la patología.

[00170] El paciente o sujeto que tiene una patología, es decir, un paciente o sujeto tratado por medio de los métodos

de esta invención, puede ser un vertebrado, más particularmente un mamífero, o más particularmente un humano.

[00171] En la práctica, los aptámeros o sus sales farmacéuticamente aceptables, son administrados en cantidades que serán suficientes para ejercer su actividad biológica deseada, por ejemplo, inhibiendo a unión del IL-23 y/o IL-12 a su receptor.

[00172] Un aspecto de la invención comprende una composición de aptámero de la invención en combinación con otros tratamientos para las enfermedades inflamatorias y auto inmunes, cáncer, y otros desordenes relacionados. La composición de aptámero de la invención puede contener, por ejemplo, más de un aptámero. En algunos ejemplos, una composición de aptámero de la invención, que contiene uno o más compuestos de la invención, se administra en combinación con otra composición útil tal como un agente antiinflamatorio, un inmunosupresor un agente anti viral, o similar. Adicionalmente, los compuestos de la invención se pueden administrar en combinación con agente citotóxico, citostático o quimioterapéutico, tal como un agente alquilatante, antimetabolito, inhibidor mitótico o antibiótico citotóxico, como se describió anteriormente. En general, las formas de dosis habitualmente disponibles de los agentes terapéuticos conocidos para uso en tales combinaciones será adecuado. Ç

[00173] "Terapia de combinación" (o "co-terapia") incluye la administración de una composición de aptámero en la invención y al menos un segundo agente como parte del régimen de tratamiento especifico destinado a suministrar el efecto benéfico de la coacción de estos agentes terapéuticos. El efecto benéfico de la combinación incluye, pero no está limitada a, coacción farmacocinética o farmacodinámica que resulta de la combinación de los agentes terapéuticos. La administración de estos agentes terapéuticos en combinación típicamente es llevada a cabo durante un periodo de tiempo definido (usualmente minutos, horas, días, o semanas dependiendo de la combinación seleccionada.

[00174] "Terapia de combinación" puede, pero generalmente no está destinada a comprender la administración de dos o más de éstos agentes terapéuticos como parte de unos regimenes de monoterapia separados que incidental y arbitrariamente dan como resultado la combinación de la presente invención. "Terapia de combinación" está destinado a abarcar la administración de estos agentes terapéuticos de una manera secuencial, esto es, en donde cada agente terapéutico se administra en un momento diferente, así como también la administración de estos agentes terapéuticos, o al menos dos de los agentes terapéuticos, de una manera sustancialmente simultanea. La administración sustancialmente simultánea se puede lograr, por ejemplo, al administrar al sujeto una

cápsula simple que tiene una proporción de cada agente terapéutico o en cápsulas múltiples, simples para cada uno de los agentes terapéuticos.

[00175] La administración secuencial o sustancialmente simultánea de cada agente terapéutico se puede efectuar mediante una ruta apropiada, que incluye, pero no está limitada a, rutas tópicas, rutas orales, rutas intravenosas, rutas intramusculares, y absorción directa a través de los tejidos de membrana de la mucosa. Loa agentes terapéuticos se pueden administrar por la misma ruta o por diferentes rutas. Por ejemplo, un primer agente terapéutico de la combinación seleccionada se puede administrar mediante inyección aunque otros agentes terapéuticos de la combinación se pueden administrar tópicamente.

[00176] Alternativamente, por ejemplo, todos los agentes terapéuticos se pueden administrar tópicamente o todos los agentes terapéuticos se pueden administrar mediante inyección. La secuencia en todos los agentes terapéuticos son administrados no es estrechamente crítica a menos que se anote de otra forma. "Terapia de combinación" también puede abarcar la administración de los agentes terapéuticos como se describió anteriormente en combinaciones adicionales con otros ingredientes biológicamente activos. Donde la terapia de combinación comprende además un tratamiento sin droga, el tratamiento sin droga puede ser conducido en cualquier

momento adecuado en tanto que el efecto benéfico de la coacción de la combinación de los agentes terapéuticos y el tratamiento sin droga se logre. Por ejemplo, en casos apropiados, el efecto benéfico se logra aún cuando el tratamiento sin droga se remueve temporalmente de la administración de los agentes terapéuticos, quizás en días o aun semanas.

[00177] Las composiciones terapéuticas farmacológicas de la presente invención comprenderán generalmente una cantidad efectiva de los componentes activos de la terapia, disuelta o dispersa en un medio farmacéuticamente aceptable. Los medios o vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen cualquiera y todos los solventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacteriales y antifungosos, agentes isotónicos y de retrazo de absorción y similares. El uso de tales medios y agentes para las sustancias farmacéuticas activas es bien conocido en la técnica. Los ingredientes suplementarios activos también se pueden incorporar en las composiciones terapéuticas de la presente invención.

[00178] La preparación de las composiciones farmacéuticas o farmacológicas será conocido por aquellos expertos en la técnica a la luz de la presente descripción. Típicamente, tales composiciones se pueden preparar como inyectables, o como soluciones o suspensiones líquidas; formas sólidas adecuadas para solución en, o suspensión en, líquidos antes

de inyección; como tabletas u otros sólidos para la administración oral; como cápsulas de liberación en el tiempo; o en cualquier otra forma habitualmente utilizada, que incluye gotas para ojo, cremas, lociones, emplastos, inhalantes y similares. El uso de formulaciones estériles, tales como lavado de solución salina, por cirujanos, médicos o trabajadores del cuidado de la salud para tratar un área particular en el campo de operación también puede ser particularmente útil. Las composiciones también se pueden suministrar por vía de un micro dispositivo, micro partícula o esponja.

[00179] Luego de la formulación, los terapéuticos serán administrados de una manera compatible con la formulación de dosis, y en tal cantidad como es farmacológicamente efectiva. Las formulaciones son fácilmente administradas en una variedad de formas de dosis, tal como el tipo de soluciones inyectables descritas anteriormente, pero las cápsulas de liberación de droga y similares también se pueden emplear.

[00180] En este contexto, la cantidad del ingrediente activo y volumen de la composición a ser administrada depende del animal huésped a ser tratado. Las cantidades precisas del compuesto activo requeridas para la administración dependen del juicio del practicante y son peculiares para cada individuo.

[00181] Un volumen mínimo de una composición requerido para dispersar los compuestos activos es el que se utiliza típicamente. Los regímenes adecuados para la administración también son variables, pero estarían tipificados al administrar inicialmente el compuesto y monitorear los resultados y luego dar dosis controladas adicionales a intervalos adicionales.

[00182] Por ejemplo, para la administración oral en la forma de una tableta o cápsula (por ejemplo una cápsula de gelatina), el componente de droga activo se puede combinar con un vehículo oral, no tóxico, farmacéuticamente aceptable inerte tal como etanol, glicerol, agua y similar. Más aun, cuando se desea o es necesario, ligadores adecuados, lubricante, agentes desintegrantes, y agentes colorantes también se pueden incorporar en la mezcla. Los ligadores adecuados incluyen almidón, aluminio silicato de magnesio, pasta de almidón, gelatina, metilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio y/o polivinilpirrolidona, azucares naturales tales como glucosa o betalactosa, endulzantes de maíz, gomas naturales y sintéticas tales como acacia, tragacanto o alginato de sodio, polietileno glicol, ceras, y similares. Los lubricantes utilizados en estas formas de dosis incluyen oleato de sodio, estearato de sodio, estearato de magnesio, benzoato de sodio, acetato de sodio, cloruro de sodio, sílice, talco, ácido esteárico, su sal de magnesio o calcio y/o polietilenglicol, y similar. Los

desintegradotes incluyen sin limitación, almidón, metilcelulosa, agar, bentonita, almidones de goma xantano, agar, ácido algínico o su sal de sodio, o mezclas efervescentes, y similares. Los diluyentes, incluyen, por ejemplo, lactosa, dextrosa, sucrosa, manitol, sorbitol, celulosa y/o glicina.

[00183] Los compuestos de la invención también se pueden administrar en tales formas de dosis oral como tabletas o cápsulas de liberación en el tiempo y liberación sostenida, píldoras, polvos, gránulos, elixires, tinturas, suspensiones, melazas y emulsiones. Los supositorios son preparados de manera ventajosa de emulsiones o suspensiones grasas.

[00184] Las composiciones farmacéuticas se pueden esterilizar y/o contienen adyuvantes, tales como agentes preservantes, estabilizantes, humectantes, humectantes o emulsificantes, promotores de solución, sales para regular la presión osmótica y/o amortiguadores. Además, ellos también pueden contener otras sustancias terapéuticamente valiosas. Las composiciones se preparan de acuerdo con una mezcla convencional, granulando, o con métodos de recubrimiento, y típicamente contienen aproximadamente 0.1% a 75%, preferiblemente aproximadamente 1% a 50%, del ingrediente activo.

426

[00185] El líquido, particularmente en las composiciones inyectables pueden, por ejemplo, ser preparadas al disolver, dispersarse, etc. El compuesto activo se disuelve o se mezcla con un solvente farmacéuticamente puro tal como, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa acuosa, glicerol, etanol, y similares, para formar de esta manera la solución a la suspensión inyectable. Adicionalmente, las formas sólidas adecuadas para disolverse en líquido antes de la inyección se pueden formular.

[00186] Los compuestos de la presente invención se pueden administrar en forma intravenosa (tanto en bolo como infusión) intraperitoneal, subcutánea o intramuscular, todas utilizando formas bien conocidas por aquellos versados en las técnicas farmacéuticas. Los inyectables se pueden preparar en formas convencionales, o en soluciones o suspensiones liquidas.

[00187] La administración inyectable parenteral se utiliza en general para inyecciones subcutáneas, intramusculares o intravenosa e infusiones. Adicionalmente, una aproximación para la administración parenteral emplea la implantación de sistemas de liberación lento o liberación sostenida, que aseguran que se mantenga un nivel constante de dosis, de acuerdo con la patente No 3,710,795, incorporado aquí como referencia.

[00188] Adicionalmente, los compuestos preferidos para la presente invención se pueden administrar en forma intranasal por vía de uso tópico de vehículos intranasales adecuados, inhalantes, o por vías de rutas transdérmicas, utilizando estas formas de los parches de piel transdérmico bien conocidos por aquellos versados en la técnica. Para ser administrado en la forma de un sistema de suministro transdérmico, la administración de la dosis, por supuesto, será continua en lugar de intermitente a través del régimen de dosis. Otras preparaciones tópicas preferidas incluyen cremas, ungüentos, lociones, pulverizados en aerosol y geles, en donde la concentración del ingrediente activo variaría típicamente de 0.01% a 15%, p/p o P/v.

[00189] Para las composiciones sólidas, los excipientes incluyen grados farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio sacarina de sodio, talco, celulosa, glucosa, sucrosa, carbonato de magnesio y similares. El compuesto activo definido anteriormente, se puede formular en supositorios, utilizando por ejemplo, polialquilenglicoles, por ejemplo, propilenglicol, como el vehículo. En algunas modalidades, los supositorios se preparan ventajosamente de emulsiones o de suspensiones grasas.

[00190] Los compuestos de la presente invención se pueden administrar en la forma de sistemas de suministro de liposoma, tal como vesículas unilamelares pequeñas, vesículas

unilamelares grandes y vesículas multilamerales. Los liposomas se pueden formar de una variedad de fosfolípidos, que contienen colesterol, estearilamina o fosfatidilcolina. En algunas modalidades una película de componentes lípidos se hidrata con una solución acuosa de droga para formar una capa de lípido que encapsula la droga, como se describió en la patente U.S. No 5,262,564. Por ejemplo, las moléculas de aptámero descritas aquí se pueden suministrar como un complejo con un compuesto fosfofílico o no inmunogénico, un compuesto de alto peso molecular construido utilizando los métodos conocidos en la técnica. Un ejemplo de complejos asociados a ácido nucleico se suministra en la patente U.S. No. 6,011,020.

[00191] Los compuestos de la presente invención también se pueden acoplar con polímeros solubles como vehículos para droga con blanco. Tales polímeros pueden incluir polivinilpirrolidona, el copolímero piran, polihidroxipropil-metacrilamida -fenol, polihidroxietilaspanamidefenol, o polietilenoxidepolilisina sustituida con residuos de palmitoilo. Adicionalmente, los compuestos de la presente invención se pueden acoplar a una clase de polímeros biodegradables útiles para lograr la vibración controlada de una droga, por ejemplo, ácido poliláctico, poliepsilón caprolactona, ácido polihidroxibutírico, poliortoesteres, poliacetales, polihidropiranos, policianoaquilatos y copolímeros de bloque reticulado de hidrogeles.

[00192] Si se desea, la composición farmacéutica a ser administrada también puede contener cantidades menores de sustancias auxiliares no toxicas tales como agentes humectantes y emulsificantes, agentes amortiguantes de pH, y otras sustancias tales como por ejemplo, acetato de sodio, y oleato de trietanolamina.

[00193] El régimen de dosis que utiliza los aptámeros se selecciona de acuerdo con una variedad de factores que incluyen tipo, especies, edad, peso, sexo y condición medica del paciente; la severidad de la condición a ser tratada; la ruta de administración; la función renal y hepática del paciente; y el aptámero particular o la sal empleada de este. Un médico o veterinario medianamente versado puede fácilmente determinar y predescribir la cantidad efectiva de la droga requerida para evitar, contrarrestar o disminuir el progreso de la condición.

[00194] Las dosis orales de la presente invención, cuando se utilizan para los efectos indicados variarán entre aproximadamente 0.05 a 7500 mg/día oralmente. Las composiciones son preferiblemente suministradas en la forma de tabletas graduadas que contienen 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 10.0, 15.0, 25.0, 50.0, 100.0, 250.0, 500.0 y 1000.0 mg de ingrediente activo. Las dosis infundidas las dosis intranasales y las dosis transdérmicas variaran entre 0.05 a

7500 mg/día. Las dosis subcutáneas, intravenosas e intraperitoneales variaran entre 0.05 y 3800 mg/día.

[00195] Los niveles de plasma efectivos de los compuestos de la presente invención varían desde 0.002 mg/mL a 50 mg/mL.

[00196] Los compuestos de la presente invención se pueden administrar en una dosis diaria simple de la dosis diaria total a ser administrada en dosis divididas de dos, tres o cuatro veces diariamente.

MODULACIÓN DE LOS FARMACOCINÉTICOS Y BIODISTRIBUCIÓN DE LOS TERAPÉUTICOS DE APTÁMERO

[00197] Es importante que las propiedades farmacocinéticas de todos los terapéuticos basados en oligonucleótido, que incluyen los aptámeros, sean ajustadas para coincidir con la aplicación farmacéutica deseada. Aunque los aptámeros dirigidos contra los blancos extracelulares no sufren de las dificultades asociadas con el suministro intracelular (como es el caso con los terapéuticos basados en contrasentido o ARNi), tales aptámeros pueden ser capaces de ser distribuidos a órganos y tejidos blancos y permanecer en el cuerpo (no modificado) durante un periodo consistente con el régimen de dosificación deseado.

[00198] Así, la presente invención suministra materiales y métodos para afectar los farmacocinéticos de las composiciones de aptámero, y, en particular, la capacidad de sintonizar los farmacocinéticos del aptámero. La sintonizabilidad de (es decir la capacidad de modular) los farmacocinéticos de aptámero se logra a través de la conjugación de porciones modificantes (por ejemplo polímeros PEG) para el aptámero y/O la incorporación de nucleótidos modificados (por ejemplo 2'-fluoro o 2'-metil) para alterar la composición química del ácido nucleico. La capacidad para sintonizar los farmacocinéticos de aptámero se utiliza en la mejora de las aplicaciones terapéuticas existentes, o alternativamente en el desarrollo de nuevas aplicaciones terapéuticas. Por ejemplo, en algunas aplicaciones terapéuticas, por ejemplo, en configuraciones para el cuidado antineoplásico o agudo donde una limpieza o apagado rápido de la droga puede ser deseable, es deseable disminuir los tiempos de residencia de los aptámeros en la circulación. Alternativamente, en otras aplicaciones terapéuticas, como por ejemplo, terapias de mantenimiento donde la circulación sistémica de la terapia se desea, puede ser deseable incrementar los tiempos de residencia de los aptámeros en circulación.

[00199] A demás, la sintonizabilidad de los farmacocinéticos de aptámero se utiliza para modificar la biodistribución de un terapéutico de aptámero en un sujeto.

Por ejemplo, en algunas aplicaciones terapéuticas puede ser deseable alterar la biodistribución de un terapéutico de aptámero en un esfuerzo para apuntar a un tipo particular de tejido o un órgano específico (o conjunto de órganos). En estas aplicaciones, el terapéutico de aptámero acumula preferencialmente en un tejido específico o órganos u órganos. En otras aplicaciones terapéuticas puede ser deseable apuntar a tejidos que despliegan un marcador celular o un síntoma asociado con una enfermedad dada, daño celular u otra patología anormal, de tal forma que el terapéutico de aptámero se acumula preferencialmente en el tejido afectado. Por ejemplo, como se describió en la solicitud provisional aplicada pendiente de los Estados Unidos serie No 60/550790, presentada en marzo 5 del 2004, y titulada "Controlled Modulation of the Pharmacokinetics and Biodistribution of Aptamer Therapeutics", y en la solicitud Estadounidense no provisional No. 10/-,-, presentada en marzo 7 del 2005, también titulada "Controlled Modulation of the Pharmacokinetics and Biodistribution of Aptamer Therapeutics", la PEGylacion de un terapéutico de aptámero (por ejemplo PEGylacion de un polímero PEG de 20 kDa) se utiliza para apuntar a tejidos inflamados blanco, de tal forma que el terapéutico de aptámero PEGylado se acumula preferencialmente en el tejido inflamado.

[00200] Para determinar los perfiles farmacocinéticos y la biodistribución de los terapéuticos de aptámero (por ejemplo

los conjugados de aptámero los aptámeros que tienen químicas alteradas, tales como nucleótidos modificados) son monitoreados de una variedad de parámetros. Tales parámetros incluyen por ejemplo, la vida media ($t_{1/2}$), la limpieza de plasma (Cl), el volumen de distribución (V_{ss}), el área bajo la curva del tiempo de concentración (AUC), la concentración de suero o plasma máxima observada (C_{max}), y el tiempo de residencia medio (MRT) de una composición de aptámero. Como se utiliza aquí, el termino "AUC" se refiere al área bajo la grafica de concentración de plasma del terapéutico de aptámero versus el tiempo después de la administración del aptámero. El valor AUC se utiliza para estimar la biodisponibilidad (es decir, el porcentaje de terapéutico aptámero administrado en circulación después de la administración de aptámero) y/o la limpieza total (Cl) (es decir la proporción en la cual se remueve el terapéutico de aptámero de circulación) de un terapéutico de aptámero dado. El volumen de distribución se relaciona con la concentración de plasma de un terapéutico de aptámero a la cantidad de aptámero presente en el cuerpo. Entre mayor el Vss, más se encuentra un aptámero por fuera del plasma (es decir, mayor la extravasación).

[00201] La presente invención suministra materiales y métodos para modular, de una manera controlada, los farmacocinéticos y la biodistribución de las composiciones de aptámero estabilizadas en vivo al conjugar un aptámero a, o

modular la porción tal como una molécula pequeña, péptido, o grupo terminal polímero, o al incorporar los nucleótidos modificados en un aptámero. Como se describe aquí, la conjugación de una porción modificatoria y/o la composición química del o los nucleótidos alterantes alteran los aspectos fundamentales del tiempo de residencia del aptámero en circulación y distribución a los tejidos.

[00202] Además de la limpieza por nucleasas, los terapéuticos de oligonucleótidos son sometidos a eliminación por vía de filtración renal. Como tales, los oligonucleótidos resistentes a la nucleasa administrados intravenosamente exhiben típicamente una vida media in vivo de <10 min, a menos que la filtración se pueda bloquear. Esto se puede lograr al facilitar la distribución rápida por fuera del torrente sanguíneo en los tejidos o al incrementar el peso molecular aparente del nucleótido por encima del corte de tamaño efectivo del glomerulo. La conjugación de los terapéuticos pequeños al polímero PG (PEGilación), descrito adelante, puede dramáticamente alargar los tiempos de residencia de los aptámeros en circulación, disminuyendo de esta manera la frecuencia de dosificación y mejorando la efectividad contra los blancos vasculares.

[00203] Los aptámeros se pueden conjugar en una variedad de porciones modificantes tal como polímeros de alto peso molecular, por ejemplo, PEG; péptidos, por ejemplo, Tat (y el

fragmento de aminoácido 13 de la proteína HIV Tat (Vives et al., (1997), J. Biol. Chem. 272(25): 16010-7)), Ant (una secuencia de 16 aminoácidos derivada de la tercera hélice de la proteína homeotica dedrosofila antenapedia (Pietersz, et al., (2001), Vaccine 19(11-12): 1397-405)) y Arg_7 (péptidos permeantes de célula corta positivamente cargada compuesta de poliarginina (Arg7) (Rothbard, et al., (2000), Nat. Med. 6(11): 1253-7; Rothbard, J et al., (2002), J. Med. Chem. 45(17): 3612-8)); y moléculas pequeña, por ejemplo, compuestos lipofílicos tales como colesterol. Entre los varios conjugados descritos aquí, las propiedades in vivo de los aptámeros son alteradas más profundamente mediante complejación con grupos PEG. Por ejemplo, la complejación de un terapéutico de aptámero 2'f y 2'-OMe modificado con un polímero de PEG de 20 kDa oculta la filtración renal y promueve la distribución de aptámero a tejidos tanto saludables como inflamados. Adicionalmente un conjugado de aptámero de polímero PEG de 20 kDa prueba ser aproximadamente efectivo como un polímero PEG de 40 kDa para prevenir la filtración renal de los aptámeros. Aunque un efecto de la PEGilacion es sobre la limpieza del aptámero, la exposición sistémica prolongada lograda mediante la presencia de la porción de 20 kDa también facilita la distribución del aptámero a los tejidos, particularmente aquellos de órganos altamente prefusionados en aquellos en un sitio de la inflamación. El conjugado de polímero PEG de 20 kDa de aptámero dirige la distribución de aptámero al sitio de la

inflamación de tal forma que el aptámero PEGilado se acumula en el tejido inflamado. En algunos casos, el conjugado de aptámero PEGilado de 20 kDa es capas de acceder al interior de las células tal, por ejemplo, células de riñón.

[00204] Los nucleótidos modificados también se pueden utilizar para modular la limpieza del plasma de los aptámeros. Por ejemplo, un aptámero no conjugado que incorpora ambas químicas estabilizantes 2′-F y 2′-OMe, el cual es típicamente de aptámeros de generación habitual en razón a que este exhibe un alto grado de estabilidad de nucleasa in Vitro e in vivo, despliega una perdida rápida del plasma (es decir limpieza del plasma rápida) y una distribución rápida en los tejidos, principalmente en el riñón, cuando se compara con un aptámero no modificado.

ÁCIDOS NUCLEICOS DERIVADOS DE PEG

[00205] Como se describió anteriormente la derivación de los ácidos nucleicos con polímeros no inmunogénicos de alto peso molecular tiene el potencial de alterar las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas de los ácidos nucleicos que los hace agentes terapéuticos más efectivos. Los cambios favorables en la actividad puede incluir la resistencia creciente a la degradación por las nucleasas, la filtración disminuida a través de los riñones, la exposición disminuida

al sistema inmune, y la distribución alterada del terapéutico a través del cuerpo.

[00206] Las composiciones de aptámero de la invención se pueden derivar con las porciones de polialquilenglicol ("PAG"). Los ejemplos de los ácidos nucleicos PAG derivados se encuentran en las solicitudes en Estados Unidos Ser No. 10/718,833, presentada en noviembre 21 del 2003, que se incorpora aquí como referencia en su totalidad. Los polímeros típicos utilizados en la invención incluyen polietilenglicol ("PEG"), también conocido como oxido de polietileno ("PEO") y polipropilenglicol (que incluye poli isopropilglicol). Adicionalmente, los copolímeros aleatorios o de bloque de los diferentes óxidos de alquileno (por ejemplo óxido de etileno y óxido de propileno) se pueden utilizar en muchas aplicaciones. En la forma más común el polialquilenglicol, tal como el PEG, es un polímero lineal terminado en cada extremo con grupos de hidroxilos: $HO-CH_2CH_2O-(CH_2CH_2O)_n-CH_2CH_2-OH$. Este polímero, alfa-, omega-dihidroxipolietilenglicol, también se puede representar como HO-PEG-OH. Donde se entiende que el símbolo PEG representa la siguiente unidad estructural: $-CH_2CH_2O-(CH_2CH_2O)_n-CH_2CH_2-$ donde n típicamente varía desde aproximadamente 4 a aproximadamente 10000.

[00207] Como se muestra, la molécula de PEG es disfuncional y se denomina algunas veces como un "PEG diol". Las porciones terminales de la molécula de PEG son porciones hidroxilos

relativamente no reactivas, los grupos OH, se pueden activar, o convertir a porciones funcionales, para la unión del PG a los otros compuestos en los sitios reactivos sobre el compuesto. Tales PEG dioles activados son denominados aquí como PEGs bi activados. Por ejemplo, las porciones terminales del PEG diol han sido funcionalisadas como ester de carbonato activo para la reacción selectiva con porciones amino mediante la sustitución de porciones hidroxilo relativamente no reactivas, -OH, con porciones de ester de succinimidilo activo proveniente de N-hidroxi succinimida.

[00208] En otras aplicaciones, es deseable encasquetar la molécula de PEG en un extremo con una porción esencialmente no reactiva de tal forma que la molécula de PEG sea monofuncional (o monoactivada). En el caso de los terapéuticos de proteína que generalmente despliegan sitios de reacción múltiples para los PEG activados, los PEG bifuncionales activados conducen a una reticulación extensiva que produce agregados pobremente funcionales. Para generar los PEG monoactivados, una porción hidroxilo sobre el terminal de la molécula de PEGdiol es típicamente sustituida con una porción de extremo metoxi no reactiva, $-OCH_3$. El otro terminal no encasquetado de la molécula PEG típicamente es convertido a una porción de extremo reactiva que se puede activar al unirse en un sitio reactivo sobre la superficie o una molécula tal como una proteína.

[00209] Los PAG son polímeros que típicamente tienen las propiedades de solubilidad en el agua y en muchos solventes orgánicos, les falta toxicidad, y les falta la inmunogenicidad. Aquel que utilice los PAG para unirse covalente mente al polímero a moléculas insolubles para hacer las moléculas PAG resultantes solubles al "conjugado". Por ejemplo, se ha mostrado que el paclitaxel droga insoluble al agua, cuando se acopla al PEG se vuelve soluble al agua. Greenwald, et al., J. Org. Chem., 60:331-336 (1995). Los conjugados de PAG son a menudo utilizados no solamente para mejorar la solubilidad y estabilidad sino también para prolongar la vida media de la circulación sanguínea de las moléculas.

[00210] Los compuestos polialquilados de la invención están típicamente entre 5 y 80 kDa en tamaño sin embargo cualquier tamaño se puede utilizar, la escogencia dependiente del aptámero y la aplicación. Otros compuestos de PAG de la invención están entre 10 y 80 kDa en tamaño. Aun otros compuestos PAG de la invención están entre 10 y 60 kDa en tamaño. Por ejemplo, el polímero PAG puede ser al menos 10, 20, 30, 40, 50, 60 y 80 kDa de tamaño. Tales polímeros pueden ser lineales o ramificados. En algunas modalidades los polímeros son PEG. En algunas modalidades los polímeros son PEG ramificados. En aun otras modalidades el polímero o los polímeros son PEG ramificados de 40 kDa como se describe en la figura 4. En algunas modalidades el PEG ramificado de 40

kDa se une al extremo 5´del aptámero como se describió en la figura 5.

[00211] En contraste a los terapéuticos de proteína biológicamente expresados los terapéuticos de ácido nucleico son típicamente químicamente sintetizados de nucleótidos de monómeros activados. Los conjugados de PEG-ácido nucleico se pueden preparar al incorporar el PEG utilizando la misma síntesis de monómero iterativa. Por ejemplo, los PEG activados mediante conversión a una forma de fosforamidita se pueden incorporar en la síntesis de oliglonucleótido de fase sólida. Alternativamente, la síntesis de oliglonucleótido se puede completar con una incorporación específica al sitio de un sitio de unión PEG reactivo. más comúnmente esto se a logrado mediante la adición de una amina primaria libre en el terminal 5´ (incorporada utilizando una fosforamidita modificadora en la ultima etapa acoplante de la síntesis de fase sólida). Utilizando esta aproximación, un PEG reactivo (por ejemplo uno que se activa de tal forma que reaccionara y formara una unión con una amina) se combina con el oligonucleótido purificado y la reacción de acoplamiento se lleva a cabo en solución.

[00212] La capacidad de la conjugación del PEG para alterar la biodistribución de un terapéutico se relaciona con un numero de factores que incluye el tamaño aparente (por ejemplo medido en términos de radio hidrodinámico) del

441

conjugado. Los conjugados mayores (>10 kDa) son conocidos por bloquear más efectivamente la filtración por vía del riñón y por incrementar consecuentemente la vida media del suero de las macromoléculas pequeñas (por ejemplo péptidos, oligonucleótidos contrasentido). La capacidad del PEG conjuga la filtración de bloque a mostrado que se incrementa con el tamaño del PEG hasta aproximadamente 50 kDa (los incrementos adicionales tienen un efecto beneficio mínimo en razón a que la vida media se define mediante el metabolismo mediado por macrófago en lugar de eliminación por vía de los riñones).

[00213] La producción de PEGs de alto peso molecular (>10 kDa) puede ser difícil, ineficiente y costosa. Como una ruta hacia la síntesis de los conjugados de ácido nucleico PEG de alto peso molecular, se a enfocado el trabajo previo hacia la generación de PEGs activados de mayor peso molecular. Un método para generar moléculas involucra la formación de un PEG activado ramificado en el cual se unen dos o más PEG a un núcleo central que lleva el grupo activado. Las porciones terminales de estas moléculas PEG de peso molecular mayor es decir, las porciones hidroxilo (-OH) relativamente no reactivas, se pueden activar o convertir a porciones funcionales, para unirse a uno o más de los PEG a los otros compuestos en los sitios reactivos sobre el compuesto. Los PEGs activados ramificados tendrán más de dos terminales, y en el caso donde dos o más terminales han sido activadas, tales moléculas PEG de peso molecular mayor activados se

denominan aquí como PEGs multiactivados. En algunos casos, no todos los terminales en la molécula PEG ramificada son activados. En los casos donde cualquiera de los dos terminales de una molécula PEG ramificada se activan, tales moléculas PEG se denominan como PEG biactivados en algunos casos donde solamente un terminal en la molécula PEG ramificada se activa tales moléculas PEG son denominadas como monoactivadas. Como un ejemplo de esta aproximación, el PEG activado preparado mediante la unión de los dos monometoxi PEG a un núcleo de glicina que es subsecuentemente activado para reacción se ha descrito (Harris et al., Nature, Vol.2:214-221,2003).

[00214] La presente invención suministra otra ruta efectiva en costo para la síntesis de conjugados de PEG ácido nucleico de alto peso molecular (preferiblemente, aptámero) que incluye ácidos nucleicos PEGilados multicapa. La presente invención también comprende oligonucleótidos multiméricos PEG-ligados, por ejemplo, aptámeros dimerizados. La presente invención también se relaciona con composiciones de alto peso molecular donde la porción PEG estabilizante es un ligador que separa diferentes porciones de un aptámero por ejemplo, el PEG se conjuga dentro de una secuencia de aptámero simple, de tal forma que la disposición lineal de la composición de aptámero de alto peso molecular es, por ejemplo, ácido nucleico-PEG-ácido nucleico (-PEG-ácido nucleico)$_n$ donde n es mayor o igual a 1.

[00215] Las composiciones de alto peso molecular de la invención incluyen aquellas que tienen un peso molecular de al menos 10 kDa. Las composiciones típicamente tienen un peso molecular entre 10 y 80 kDa de tamaño. Las composiciones de alto peso molecular de la invención son de al menos 10, 20, 30, 40, 50, 60 o 80 kDa de tamaño.

[00216] Una porción estabilizante es una molécula o porción de una molécula, que mejora las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas de las composiciones de aptámero de alto peso molecular de la invención. En algunos casos, la porción estabilizante es una molécula o porción de una molécula que lleva dos o más aptámeros o dominios de aptámeros, en la proximidad, o suministra una libertad rotacional total disminuida de las composiciones de aptámero de alto peso molecular de la invención. Una porción estabilizante puede ser un polialquilenicol, tal como un polietilenglicol, que puede ser lineal o ramificado, o un homopolímero o un heteropolímero. Otras porciones estabilizantes incluyen polímeros tales como ácidos nucleicos de péptido (PNA). Los oligonucleótidos también pueden ser porciones establizantes; tales oligonucleótidos pueden incluir un nucleótido modificado y/o enlaces modificados tales como fosforotioatos. Una porción estabilizante puede ser una parte integral de una composición de aptámero, es decir, que esta covalentemente unida al aptámero.

[00217] Las composiciones de la invención incluyen composiciones de aptámero de alto peso molecular en las cuales dos o más porciones de ácido nucleico están covalentemente conjugadas a al menos una porción de polialquilenglicol. Las porciones de polialquilenglicol sirven como porciones estabilizantes. En las composiciones donde la porción de polialquilenglicol está covalentemente unida a cualquier extremo de un aptámero, de tal forma que el polialquilenglicol se une a las porciones de ácido nucleico en una molécula, el polialquilenglicol se dice que es una porción ligante. En tales composiciones, la estructura primaria de la molécula covalente incluye una disposición de ácido nucleico -PAG-ácido nucleico. Un ejemplo es una composición que tiene una estructura ácido nucleico-PEG-ácido nucleico. Otro ejemplo es una disposición lineal de: ácido nucleico-PEG-ácido nucleico-PEG-ácido nucleico.

[00218] Para producir el conjugado de ácido nucleico-PEG-ácido nucleico, el ácido nucleico se sintetiza originalmente de tal forma que este lleva un sitio reactivo simple (por ejemplo es monoactivado). En una modalidad preferida, este sitio reactivo es un grupo amino introducido en el terminal 5' mediante la adición de fósforo amidita modificadora como la ultima tapa en la síntesis de fase sólida del oligonucleótido. Luego de la desprotección y purificación del oligonucleótido modificado este es reconstituido a alta

concentración en una solución que minimiza la hidrólisis espontánea del PEG activado. En una modalidad preferida la concentración del oligonucleótido es 1 mM y la solución reconstituida contiene 200 mM de $NaHCO_3$-amortiguador, pH 8.3. La síntesis del conjugado se inicia mediante la adición lenta paso a paso de un PEG bi-funcional altamente purificado. En una modalidad preferida el PEG diol se activa en ambos extremos (bi-activado) mediante la derivación con succinimidil propionato. Luego de la reacción, el conjugado de PEG-ácido nucleico se purifica mediante electroforesis de gel o mediante cromatografía liquida para separar completa, parcialmente especies no conjugadas. Las moléculas PAG múltiples concatenadas (por ejemplo como copolímeros aleatorios o de bloque) o cadenas PAG pequeñas se pueden ligar para lograr longitudes varias (o pesos moleculares). Ligadores no PAG se pueden utilizar entre las cadenas PAG de longitudes varias.

[00219] El 2′-O-metil, 2′-fluoro y otras modificaciones de nucleótidos modificadas estabilizan el aptámero contra las nucleasas e incrementan su vida media in vivo. El casquete 3′-3′-dT también incrementa la resistencia a la exonucleasa, ver, por ejemplo, patente U.S. 5,674,685;5,668,264;6,207,816; y 6,229,002, cada una de las cuales incorpora como referencia aquí en su totalidad.

446

DERIVACIÓN PAG DE UN ÁCIDO NUCLEICO REACTIVO

[00220] Los Conjugados PAG-ácido nucleico-PAG de alto peso molecular se pueden preparar mediante la reacción de un PEG activado monofuncional con ácido nucleico que contiene más de un sitio reactivo. En una modalidad, el ácido nucleico es bi-reactivo, o bi-activado, y contiene dos sitios reactivos: un grupo 5'-amino y un grupo 3'-amino introducido en el oligonucleótido a través de síntesis de fosfora midita convencional, por ejemplo: 3'-5'-di-PEGilación como se ilustra en la Figura 6. En las modalidades alternativas, los sitios reactivos se pueden introducir en posiciones internas, utilizando por ejemplo, la posición 5 de las pirimidinas, la posición 8 de las purinas, o la posición 2' de las ribosas en los sitios para unión de las aminas primarias. En tales modalidades, el ácido nucleico puede tener varios sitios activados o reactivos y se dice que es múltiplemente activado. Luego de la síntesis y purificación, el oligonucleótido modificado se combina con el PEG mono activado bajo condiciones que promueven la reacción selectiva con los sitios reactivos de oligonucleótidos aunque minimizando la hidrólisis espontánea. En la modalidad preferida, el mono metoxi-PEG se activa con succinimidil propionato y la reacción acoplada se lleva a cabo a pH 8.3. Para manejar la síntesis del PEG bi sustituido, se suministra PEG con exceso estequiométrico con relación al oligonucleótido. Luego de la reacción, el conjugado de PEG-

ácido nucleico se purifica mediante electroforesis de gel o cromatografía líquida para separar las especies completa, parcial y no conjugadas.

[00221] Los dominios de enlace también pueden tener una o más porciones de polialquilenglicol unidas a este tales PAG pueden ser de longitudes variantes y se pueden utilizar en combinaciones apropiadas para lograr el peso molecular deseado de la composición.

[00222] El efecto de un ligador particular se puede influenciar tanto por su composición como por su longitud química, un ligador es demasiado largo, demasiado corto, forma interacciones estéricas y/o iónicas desfavorables con el IL-23 y el IL-12 precluirá la formación de complejo entre el aptámero y el IL-23 y el IL-12. Un ligador, que es mayor que el necesario para incrementar la distancia entre los ácidos nucleicos puede reducir la estabilidad de un Ion al disminuir la concentración efectiva del ligando. Así, es necesario a menudo utilizar las composiciones ligadoras y las longitudes con el fin de maximizar la afinidad de un aptámero a un blanco.

[00223] Todas las publicaciones y documentos de patentes citados aquí se incorporan aquí como referencia como si cada una de las publicaciones o documentos fuera especifica e individualmente indicada para ser incorporada aquí como

referencia. Las cita de las publicaciones y los documentos de patente no pretende una admisión de que cualquier técnica anterior pertinente, ni que constituye alguna admisión de los contenidos o la fecha de la misma. La invención que a sido ahora descrita por vía de descripción escrita, aquellos expertos en la técnica reconocerán que la invención se puede practicar en una variedad de modalidades y que la descripción anterior y los ejemplos de adelante son con propósitos de ilustración y no de limitación de las reivindicaciones que siguen.

EJEMPLOS

1. EJEMPLO 1: SELECCIÓN Y SECUENCIAS DE APTÁMERO.

Selección del aptámero IL-23

[00224] Varias estrategias SELEX™ fueron empleadas para generar los ligandos con una variedad de especificidades para el IL-23 y IL-12. Un esquema. Diseñado para producir los aptámeros específicos para IL-23 versus IL-12 incluyen IL-12 en una etapa de selección negativa para eliminar los aptámeros que reconocen la subunidad común y seleccionando los aptámeros específicos para el IL-23. Un esquema SELEX™ separado en el cual IL-23 y IL-12 fueron alternados cada tercer ronda y elicita aptámeros que reconocen la subunidad común y por lo tanto reconocen ambas proteínas. En los

ejemplos 1A y 1E, las selecciones fueron hechas con 2'-OH purina y 2'-F pirimidina (rRfY) que contienen grupos. Los clones de estas selecciones fueron optimizados con base en su afinidad y eficacia de unión en o para bloquear la actividad IL-23 en un ensayo basado en célula. Además, las selecciones con grupos que contienen 2'-OM nucleótido es decir rRmY (2'-OH A y G, y 2'-OMe C y U), rGmH (2'-OH G y 2'-OMe C,U,A), y dRmY (desoxi A y G, y 2¨-OMe y U) se describen en los ejemplos 1B, 1C y 1D adelante.

EJEMPLO 1A: Selecciones contra IL-23 humano con grupos que contienen 2'-Fluoro pirimidinas (rRfY).

[00225] Se desarrollaron tres selecciones para identificar los aptámeros para ("h")-IL-23 humano utilizando un grupo que consiste de 2'-OH purina (ribo-purina) y 2'-F pirimidin nucleótidos (condiciones rRfY). La primer selección (h-IL-23) fue una selección dirigida contra h-IL-23, que esta comprendida por los dominios p19 y p40. La segunda selección (X-IL-23) utilizo h-IL-23 y h-IL-12 en rondas alternativas para manejar la selección de los aptámeros a la subunidad común entre las dos proteínas, p40. La tercer selección (PN-IL-23), h-IL-12 se incluyo en la etapa de selección negativa para manejar el enriquecimiento de los aptámeros que se unen al subdominio único al h-IL-23, p19. Como se describe adelante, el material de partida para esta tercer selección, es decir la selección PN-IL-23 fue una porción del grupo

proveniente de la selección h-IL-23, separada del resto del grupo h-IL-23 después de dos rondas de selección contra la proteína h-IL-23. Todas las tres estrategias de selección que produjo los aptámeros al h-IL-23. Varios aptámeros son altamente específicos para el h-IL-23, varios muestran reactividad cruzada ante el h-IL-23 y el h-IL-12, y uno es más específico para el h-IL-12 versus h-IL-23.

[00226] La ronda 1 de la selección del h-IL-23 y el PN-IL-23 inicio con la incubación de $2x10^{14}$ las moléculas del grupo ARC 212 2´f pirimidina modificada (ID de Sec. No.: ID NO 8) (5´gggaaaagcgaaucauacacaaga-N40-gcuccgccagagaccaaccgaga3´), que incluye una espía de un grupo marcado con cuerpo α^{32}P ATP con 100 pmoles de proteína IL-23 (R&D, Minneapolis, MN) en un volumen final de 100 µL durante 1 hora a temperatura ambiente la serie de los N en el molde (SEQID NO 8) puede ser cualquier combinación de nucleótidos y da origen a la región de secuencia única de los aptámeros resultantes.

[00227] Después de la Ronda 2, el grupo se dividió en dos porciones iguales, una porción se utilizó para las rondas subsecuentes (es decir, Rondas 3-12) de la selección h-IL-23 y las otras porciones se utilizaron para las rondas subsecuentes (es decir, Rondas 3-11) de la selección PN-IL-23. La Ronda 1 de la selección X-IL-23 fue conducida similarmente, excepto el ARN de grupo que fue incubado con 50 pmoles de h-IL-23 y 50 pmoles de h-IL-12.

[00228] Todas las selecciones fueron desarrolladas en un amortiguador 1X SHMCK, pH 7.4 (20 mM Hepes pH 7.4, 120 mM de NaCl, 5 mM de KCl, 1 mM de $MgCl_2$, 1 mM de $CaCl_2$). Los complejos ARN:h-IL-23 y las moléculas libres de ARN se separaron utilizando columnas de giro de nitro celulosa de 0.45 µm de Schleicher & Schuell (Keene,NH). Las columnas fueron prelavadas con 1 mL de 1X SHMCK, y luego las soluciones que contenían ARN:proteína fueron agregadas a las columnas y giradas en una centrífuga a 1500 g durante 2 minutos. Los lavados con amortiguador se desarrollaron para remover los ligadores no específicos de los filtros (Ronda 1, 2 x 500 µL 1X SHMCK; en rondas posteriores, más lavados exigentes de número y volumen creciente para enriquecer los ligadores específicos), luego los complejos ARN:proteína unidos a los filtros fueron eluidos con lavados 2 x 200 µL (lavados 2 x 100 µL en rondas posteriores) de amortiguador de elusión (7 M de urea, 100 mM de acetato de sodio, 3 mM de EDTA, precalentada a 95°C). El ARN eluido fue extraído con fenol: cloroformo, luego precipitado (40 µg de glicógeno, 1 volumen de isopropanol). El ARN fue transcrito de manera inversa con el sistema Termoscript™ RT-PCR (Invitrogen, Carlsbad, CA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante, utilizando el iniciador 3' 5'ttctcggttggtctctggcggagc3'(SEQ ID NO 10), seguido mediante amplificación por PCR (20 mM Tris pH 8.4, 50 mM KCl, 2 mM $MgCl_2$, 0.5 µM de iniciador 5' 5'taatacgactcactatagggaaaagcgaatcatacacaaga3'(SEQ ID NO 9),

0.5 µM de iniciador 3' (SEQ ID NO 10), 0.5 mM de cada dNTP, 0.05 unidades/µL de Taq polimerasa (New England Biolabs, Beverly, MA)). Las reacciones PCR fueron hechas bajo las siguientes condiciones de ciclo: a) 94°C durante 30 segundos; b) 55°C durante 30 segundos; c) 72°C durante 30 segundos. Los ciclos se repitieron hasta que se generó suficiente producto PCR. El número mínimo de ciclos requerido para generar suficiente producto PCR se reportó en las Tablas 1-3 de adelante como el "umbral PCR".

[00229] Los moldes PCR se purificaron utilizando un kit de purificación de PCR QIAquick (Qiagen, Valencia, CA). Los moldes fueron transcritos utilizando una marcación de cuerpo α^{32}P ATP durante toda la noche a 37°C (4% PEG-8000, 40 mM Tris pH 8.0, 12 mM de $MgCl_2$, 1 mM de espermidina, 0.002% de Triton X-100, 3 mM 2'OH de purinas, 3 mM 2'F pirimidinas, 25 mM DTT, 0.0025 unidades/µL de pirofosfatazo inorgánica, 2 µg/mL de ARN polimerasa mutante simple T7 Y639F, 5 µCi α^{32}P ATP). Las reacciones fueron desalinizadas utilizando columnas Bio Spin (Bio-Rad, Hércules, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

[00230] Las rondas subsecuentes de todas las tres selecciones fueron repetidas utilizando el mismo método que para la Ronda 1, excepto para los cambios indicados en las Tablas 1-3. Antes de la incubación con la proteína blanco, el ARN de grupos se paso a través de una columna de filtro de nitro celulosa de 0.45 micras para remover las secuencias de

unión de filtro, luego el filtrado fue llevado a una etapa de selección positiva. En rondas alternativas el ARN de grupo fue purificado con gel. Las reacciones de transcripción fueron apagadas con 50 mM de EDTA y etanol precipitado luego purificado sobre gel de poliacrilamida desnaturalizante 1.5 mm (8 M de urea, 10% de acrilamida; 19:1 de acrilamida: bisacrilamida). El ARN de grupo se removió del gel mediante electro elusión con un aparato Elutrap® (Schleicher y Schuell, Keene, NH) a 225V durante 1 hora en 1X TBE (90 mM Tris, 90 mM ácido bórico, 0.2 mM EDTA). El material eluido se precipito mediante la adición de 300 nM de acetato de sodio y 2.5 volúmenes de etanol.

[00231] El ARN permaneció en exceso de la proteína a través de las selecciones (~1-2 µM de ARN). La concentración de proteína fue de 1 µM durante las primeras 2 rondas, y luego se goteo a concentraciones inferiores variantes basadas en la selección particular. Se agregó tARN competidor a las reacciones de unión de 0.1 mg/mL iniciando en la Ronda 3 o 4, dependiendo de la selección. Se completaron un total de 11-12 rondas, con ensayos de unión desarrollados en rondas de selección. Las Tablas 1-3 de adelante contienen los detalles de selección utilizados para las selecciones rRfY utilizando las estrategias de selección h-IL-23, X-IL-23, y PN-IL-23; incluyendo la concentración de ARN de grupo, la concentración de proteína, y la concentración de tARN utilizada para cada ronda. Los valores de elusión (proporción de los valores de CPM de un ARN unido a proteína versus el ARN total que fluye

454

a través de la columna de filtro) junto con los ensayos de unión de dot blot fueron utilizados para monitorear el progreso de la selección.

[00232] **Tabla 1.** Condiciones utilizadas para la selección h-IL-23.

Ronda #	Conc Grupo ARN (µM)	Tipo Proteína	Conc Proteína (µM)	Conc tARN (mg/mL)	neg	% elusión	Umbral PCR
1	3.3	Il-23	1	0	ninguno	4.38	10
2	~1	IL-23	1	0	NC	0.85	10
3	0.8	IL-23	0.75	0	NC	10.9	8
4	~1	IL-23	0.5	0.1	NC	0.53	8
5	1	IL-23	0.1	0.1	NC	1.72	11
6	~1	IL-23	0.1	0.1	NC	0.11	12
7	1	IL-23	0.1	0.1	NC	1.15	8
8	~0.5	IL-23	0.05	0.1	NC	0.12	11
9	0.5	IL-23	0.05	0.1	NC	3.54	8
10	~0.5	IL-23	0.05	0.1	NC	0.18	12
11	0.5	IL-23	0.025	0.1	NC	1.09	12
12	~0.5	IL-23	0.025	0.1	NC	0.07	12

[00233] **Tabla 2.** Condiciones utilizadas para la selección X-IL-23.

Ronda #	Conc Grupo ARN (µM)	Tipo Proteína	Conc Proteína (µM)	Conc tARN (mg/mL)	neg	% elusión	Umbral PCR
1	3.3	IL-23/ IL-12	0.5 cada uno	0	ninguno	3.15	10
2	~1	IL-23/ IL-12	0.5 cada uno	0	NC	0.56	10
3	0.8	IL-12	0.75	0	NC	0.58	13
4	~1	IL-23	0.75	0.1	NC	0.37	8
5	1	IL-12	0.5	0.1	NC	0.38	11
6	~1	IL-23	0.1	0.1	NC	0.08	12
7	1	IL-12	0.1	0.1	NC	0.50	9
8	~0.5	IL-23	0.05	0.1	NC	0.10	11
9	0.5	IL-12	0.05	0.1	NC	0.83	11
10	~0.5	IL-23	0.05	0.1	NC	0.17	8
11	0.5	IL-12	0.025	0.1	NC	0.91	12
12	~0.5	IL-23	0.025	0.1	NC	0.05	12

[00234] **Tabla 3.** Condiciones utilizadas para PN-IL-23.

Ronda #	Conc Grupo ARN (µM)	Tipo Proteína	Conc Proteína (µM)	Conc tARN (mg/mL)	neg	IL-12 Neg Conc (µM)	% elusión	Umbral PCR
1	3.3	IL-23	1	0	ninguno	0	4.38	10
2	~1	IL-23	1	0	NC	0	0.85	10
3	0.8	IL-23	0.75	0.1	NC/IL-12	0.75	1.15	10
4	~1	IL-23	0.75	0.1	NC/IL-12	0.75	0.59	10
5	0.7	IL-23	0.5	0.1	NC/IL-12	0.5	4.19	10
6	~1	IL-23	0.1	0.1	NC/IL-12	0.5	0.05	14
7	1	IL-23	0.1	0.1	NC/IL-12	0.5	0.38	10
8	~1	IL-23	0.1	0.1	NC/IL-12	0.3	0.18	15
9	1	IL-23	0.1	0.1	NC/IL-12	0.5	2.81	8
10	~1	IL-23	0.05	0.1	NC/IL-12	0.5	0.21	10
11	~1	IL-23	0.05	0.1	NC/IL-12	0.5	1.35	12

[00235] Monitoreando el progreso de la selección rRfY. Los ensayos de unión Dot blot se desarrollaron a través de las selecciones para monitorear la afinidad de unión de proteína de los grupos. El ARN marcado con trasa ^{32}p-se combinó con una serie de diluciones de h-IL-23 y se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos en 1X SHMCK 820 Mm Hepes, 120 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM $MgCl_2$, 1 Mm $CaCl_2$, pH 7,4) más 0.1 mg/mL tARN para un volumen final de 20µL. Las reacciones de unión se analizaron mediante filtración de nitrocelulosa utilizando un múltiple de filtración de vacío con 96 pozos Minifold I dot-blot, 96-(Schleichr & Schuell, Keene, NH). Un medio de filtración de tres capas se utilizó, que consiste (de arriba hacia abajo) de Protran nitrocelulosa (Schlicher & Schuell), Hybond-P nylon (Amersham Biosciences) y papel GB002 gel blot

(Schlicher & Schuell). El ARN que se une a la proteína® se captura sobre filtro de nitrocelulosa, mientras que el ARN no unido a proteínas se captura sobre el filtro de nylon. El papel gel blot está incluido simplemente como un medio de soporte para otros filtros. Luego de la filtración, las capas de filtro se separaron, se secaron y se expusieron sobre una pantalla de fósforo (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) y se cuantificaron utilizando un sistema de imágenes Store 860 Phosphorimager® blot (amersham Bioscience).

[00236] Cuando una proporción positiva significativa de unión de ARN en la presencia de h-IL-23 versus en la ausencia de h-IL-23 fue visto, los grupos fueron clonados utilizando un kit de clonación TOPO TA (Invitrogen, Carlsbad, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para la selección del h-IL-23 y X-IL-23, se clonaron los moldes del grupo de la Ronda 8, y 32 clones individuales de cada una de las secciones se analizaron en una pantalla dot blot de 1 punto (+/- 75 Nm h-IL-23, así como también una pantalla separada a +/- 75 nM h-IL-12). Para la selección PN-IL-23, el grupo de la Ronda 10 fue clonado y secuenciado, y se ensayaron 8 clones únicos para ensayo de proteína en una pantalla 2 blot de 1 punto +/- 20 nM h-IL-23 y una pantalla separada a +/- 20 nM h-IL-12). Subsecuentemente, el grupo de la Ronda 10 PN-IL-23 fue reclinado para las secuencia adicionales, así como también el grupo R12 PN-IL-23, y los clones fueron ensayados para unión de proteína en una

pantalla do blot de 1 punto (+/- 100 Nm h-IL-12). Para la determinación K_d, los transcriptos de clon fueron marcados en el extremo 5' con γ^{-32} P ATP. Los valores K_D fueron determinados utilizando una serie de diluciones de h-IL-23 (R&D Systems, Minneapolis, MN) en un ensayo dot blot para una secuencia única con buenas proporciones de unión +/- h-IL-23 en las pantallas iniciales, y ajustando una ecuación que describe un complejo 1:1 ARN: proteína a los datos resultantes (Unión de aptámero de fracción = amplitud* ([IL-23]/(Kd + [IL-23])) (Kaleida Graph v. 3.51. Synergy Software). Los resultados de la caracterización de unión de proteína están tabulados en la Tabla 4. Los clones con alta afinidad para h-IL-23 se prepararon y seleccionaron para funcionalidad de los ensayos basados en célula, descritos en el Ejemplo 3 adelante.

[00237] Tabla 4. La actividad de unión de clon rRfY (todas las mediciones fueron hechas en presencia de 0.1 mg/mL tARN)

Ronda 8 h-IL-23					Datos de Pantalla 1-pt	
SEQ ID NO	Nombre del Clon	K_DIL-23 (nM)	K_DIL-12 (nM)	K_DIL-2/K_D IL-23	+/-IL-23 75 nM	+/-IL-12 75 nM
15	AMX86-B5	195.5	N.B.		5.79	1.01
27	AMX86-C5	80.3	399.8	4.98	6.23	2.65
13	AMX86-D5	27.4	N.B.		7.17	1.52
16	AMX86-D6	25	N.B.		9.82	1.43
24	AMX86-E6	51.3	N.B.		9.02	1.13

22	AMX86-F6	69.1	N.B.		10.17	1.36
18	AMX86-A7	57.7	667.9	11.58	3.99	1.59
14	AMX86-B7	111	934.1	8.42	7.81	1.46
20	AMX86-C7	140.3	N.B.		4.65	0.77
19	AMX86-E7	210.2	267.5	1.27	6.79	1.23
21	AMX86-F7	147	106.4	0.72	13.07	2.49
25	AMX86-H7	89.8	N.B.		10.85	1.26
26	AMX86-C8	107.1	N.B.		5.28	1.17
23	AMX86-D8	294.2	N.B.		6.87	1.08
17	AMX86-G8	133.7	2493.1	18.65	7.26	2.05

Ronda 8 X-IL-23					Selección 1-pt	Datos
SEQ ID NO	Nombre de Clón	IL-23 K_D (nM)	IL-12 K_D (nM)	K_D IL-12/K_D IL-23	+/-IL-23 75 nM	+/-IL-12 75 nM
41	AMX86-A9	190.5	N.B.		3.55	0.68
35	AMX86-B9	23.7	847.6	35.76	12.88	1.96
32	AMX86-C9	97.9	672.8	6.87	6.07	1.86
33	AMX86-G9	109.4	N.B.		10.03	1.04
39	AMX86-H9	104.6	331.5	3.17	10.35	3.66
34	AMX86-A10	460.9	289.4	0.63	6.64	1.40
28	AMX86-B10	77.8	1038.3	13.35	4.73	2.12
42	AMX86-E10	218.1	904.6	4.15	2.44	1.37
36	AMX86-G10	73.7	356.1	4.83	9.88	2.41
37	AMX86-A11	157.2	182.4	1.16	7.05	3.23
29	AMX86-B11	179.9	5950	33.07	9.23	1.69
30	AMX86-D11	198.9	113.9	0.57	10.26	2.59
38	AMX86-F11	255.64	540.6	2.11	7.33	2.87
40	AMX86-H11	366.9	214.9	0.59	7.56	3.02
31	AMX86-F12	423.7	2910.3	6.87	11.88	2.51

Clones PN-IL-23					Datos de Selección 1-pt		
SEQ ID NO	Nombre de Clon	PN-IL-23	IL-23 K_D(nM)	IL-12 K_D	+/-IL-23 200 nM	+/-IL-23 100 nM	+/-IL-12 200 nM

		Ronda		(nM)			
43	AMX 84-A10	R10	22.3	N.B.	39.6		2.9
44	AMX 84-B10	R10	21.8	N.B.	22.7		1.3
45	AMX 84-A11	R10	17.8	N.B.	32.7		1.8
46	AMX 84-F11	R10	16.6	N.B.	22.5		0.8
47	AMX 84-E12	R10	27.8	N.B.	15.8		0.8
48	AMX 84-C10	R10	94.3	N.B.	17.7		2.2
49	AMX 84-C11	R10	15.5	286.1	23.4		2.7
50	AMX 84-G11	R10	290.7	N.B.	22.3		1.7
51	ARX33-plate1-H01	R12	77.8	N.B.		20.3	1.7
52	AMX 91-F11	R10	201.7	N.B.		11.4	2.2
53	AMX 91-G1	R10	82.3	N.B.		52.2	1.7
54	AMX 91-E3	R10	205.3	N.B.		34.4	2.9
55	AMX 91-H3	R10	265.7	N.B.		18.5	2.3
56	AMX 91-B5	R10	148.5	N.B.		11.2	0.9
57	AMX 91-A6	R10	60.3	N.B.		6.3	1.1
58	AMX 91-G7	R12	63.6	N.B.		38.1	1.9
59	AMX 91-H7	R12	71.0	N.B.		44.7	1.4
60	AMX 91-B8	R12	17.6	409.1		34.0	7.9
61	AMX 91-H8	R12	16.6	243.2		25.2	4.1
62	AMX 91-G9	R12	33.0	N.B.		31.7	1.1
63	AMX 91-D9	R12	44.6	N.B.		25.1	2.1
64	AMX 91-G11	R12	104.4	N.B.		12.5	1.7
65	AMX 91-C12	R12	30.7	N.B.		22.9	1.9
66	AMX 91-H12	R12	60.8	N.B.		48.6	1.2

N.B. = no se observa unión significativa

[00238] las secuencias de ácido nucleico de los aptámeros rRfY caracterizados en la tabla 5 se dan adelante. La única secuencia de cada aptámero adelante comienza en el nucleótido 25, inmediatamente luego de la secuencia GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGA (SEQ ID NO 11) y corre hasta que este presenta la secuencia de ácido nucleico fija 3' GCUCCGCCAGAGACCAACCGAGAA (SEQ ID NO 12).

[00239] A menos que se indique otra cosa, las secuencias individuales listadas adelante se representan en la orientación 5' a 3' y representan las secuencias que se unen al IL-23 y/o IL-12 seleccionada bajo las condiciones rRfY SELEX™ en donde las purinas (A y G) son 2'-OH y las pirimidinas (U y C) son 2' fluoro. Cada una de las secuencias citadas listadas en la Tabla 5 se puede derivar con porciones de polialquilenglicol ("PAG") y pueden o no contener taponadores (por ejemplo, un dT invertido 3').

[00240] Tabla 5. Secuencias de clon rRfY de la selección h-IL-23 (Ronda 8), selección X-IL-23 (ronda 8), selección PN-IL-23 (Ronda 10/12).

Selección h-IL-23 (Ronda 8)

461

SEQ ID NO 13 (AMX(86)-D5)
GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGAGAGGUAUGUGGUUUUGCGGAGCAACUCGUGUCAGCGGUCAGCUCCGCCAGAGACC
AACCGAGAA

SEQ ID NO 14 (AMX(86)-B7)
GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGAAUGAAUUCCGUCCACGGGCGCCCGAUGAUGUUCAGUUUUCCGGCUCCGCCAGAGACC
AACCGAGAA

SEQ ID NO 15 (AMX(86)-B5)
GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGAUUAGUCCGUGUGUUUGAAAGGCUCAUAAUGUCAGUAUCGAGCUCCGCCAGAGACC
AACCGAGAA

SEQ ID NO 16 (AMX(86)-D6)
GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGAUUAGGCGUCGGUGACAAUAACUGGUCCACGAGCAUGUCAGUGCUCCGCCAGAGACC
AACCGAGAA

SEQ ID NO 17 (AMX(86)-G8)
GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGAUGGAAGGCGAUCGUAGCAGUAACCCAAUGAUUGGGACCUAGCUCCGCCAGAGACC
AACCGAGAA

SEQ ID NO 18 (AMX(86)-A7)
GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGAUCUCUUUGGCCGACGCAACAAUGCUCUUUUCCGACCUUGCGCUCCGCCAGAGACCA
ACCGAGAA

SEQ ID NO 19 (AMX(86)-E7)
GGGAAAAGCGAAUCCUACCCAAGAUGUUGUUGGCGUUGAUCGUAUGAUUNAUGGAGNGUGUCNGUGCUCCGCCAGAGAC
CAACCGAGAA

SEQ ID NO 20 (AMX(86)-C7)
GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGAUGCGCUAUGUUUGGCUGGGAAUUGUAGCAUUGCUCAAGUGGCUCCGCCAGAGACC
AACCGAGAA

SEQ ID NO 21 (AMX(86)-F7)
GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGAUGUUGAACCUCUUGUGCGUCCCGAUGUUUNGCAAUGUGGAGCUCCGCCAGAGACC
AACCGAGAA

SEQ ID NO 22 (AMX(86)-F6)
GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGAAUGUAUACAAUGCCCUAUCGUCAGUUAGGCAUGUGUGGAUGCUCCGCCAGAGACC
AACCGAGAA

462

SEQ ID NO 23 (AMX(86)-D8)
GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGACAGAGGCAAUGAGAGCCUGGCGAUGUCAGUCGCAUCUUGCUGCUCCGCCAGAGAC
CAACCGAGAA

SEQ ID NO 24 (AMX(86)-E6)
GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGAUCGCAAAAGGAGUUUGUCUCUGCUCUCGGAGUGUGUCAGUGCUCCGCCAGAGACC
AACCGAGAA

SEQ ID NO 25 (AMX(86)-H7)
GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGAGAUGACUACACGCCAGUGUGCGCUUUUUGCGGAGUUAGCGGCUCCGCCAGAGACC
AACCGAGAA

SEQ ID NO 26 (AMX(86)-C8)
GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGAGUCGUGAUGAUUUUGGGUUAUGUCAGUUCCCUGUAUGGGUUUCGCUCCGCCAGAGAC
CAACCGAGAA

SEQ ID NO 27 (AMX(86)-C5)
GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGAGUUUUAUGUGGGUCCCGAUGAUUAACUUUAUUGGGCGCAUUGCUCCGCCAGAGACC
AACCGAGAA

Selección X-IL-23 (Ronda)

SEQ ID NO 28 (AMX(86)-B10)
GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGAGAACGAGUAUAUUUGCGCUGGCGGAGAAGUCUCUCGAAGGGAGCUCCGCCAGAGA
CCAACCGAGAA

SEQ ID NO 29 (AMX(86)-B11)
GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGAGUAUCAUUCGGCUGGUGGGAGAAAUCUCUGUAGAUAUAGAGCUCCGCCAGAGACC
AACCGAGAA

SEQ ID NO 30 (AMX(86)-D11)
GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGAUAGCGUCUAUGAUGGCGGAAGAAGCAAGUGGUAGCAUAACAGGCUCCGCCAGAGACC
AACCGAGAA

SEQ ID NO 31 (AMX(86)-F12)
GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGAGUGUUGAAUGAGCGCUGGUGGACAGAUCUUUGGUUACAGAGCUCCGCCAGAGACC
AACCGAGAA

SEQ ID NO 32 (AMX(86)-C9)
GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGACUCAUGGAUAUGGCCUAGCAGCCGUGGAAGCGGUCAUUCUGCUCCGCCAGAGACC
AACCGAGAA

SEQ ID NO 33 (AMX(86)-G9)
GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGAUCCCAGCGGUACGUGAGUCUGUUAAAGGCCACCUAAUGUCGCUCCGCCAGAGACC
AACCGAGAA

SEQ ID NO 34 (AMX(86)-A10)
GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGAGUAAUGUGGGUCCCGAUGAUUCGCUGUGGCGGCGUUUGUAGCUCCGCCAGAGACCA
ACCGAGAA

SEQ ID NO 35 (AMX(86)-B9)
GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGAGGUUGAGUACGACGGAGUCUUGGCUAACACCGAAACUAGAGCUCCGCCAGAGACC
AACCGAGAA

463

SEQ ID NO 36 (AMX(86)-G10)
GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGAGUCAUGGCUUACAAUUGAAACAAGAGCUCCGCUGACACAUGCUCCGCCAGAGACC
AACCGAGAA

SEQ ID NO 37 (AMX(86)-A11)
GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGAACGGCUAGGCAUCAAUGGCCAGCAAAAAUAGUCGUGUAAUGCUCCGCCAGAGACC
AACCGAGAA

SEQ ID NO 38 (AMX(86)-F11)
GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGAACCAUCGGACGAGGCGGGUCACCUUUUACGCUUUCGAGCUGGCUCCGCCAGAGACC
AACCGAGAA

SEQ ID NO 39 (AMX(86)-H9)
GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGAUGCGUCCCACGUGAAAGUGGCUAGCGAGUACCCCACUUAUGCUCCGCCAGAGACC
AACCAAGGG

SEQ ID NO 40 (AMX(86)-H11)
GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGAGCGCUUUAGCGGGUAUAGCACUUUUCAUCUAAUGAANCCGUAGCUCCGCCAGAGA
CCAACCGAGAA

SEQ ID NO 41 (AMX(86)-A9)
GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGAUCUACGAUUGUUCAGGUUUUUUGUACUCAACUAAAGGCGAGCUCCGCCAGAGACC
AACCGAGAA

SEQ ID NO 42 (AMX(86)-E10)
GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGAUUGUCUCCGAUUGGUCACUCCCAUUUUUGUUCGCUUAACGGCUCCGCCAGAGACC
AACCGAGAA

Selección PN-IL-23 (Ronda 10 y 12)

SEQ ID NO 43 (AMX(84)-A10)
GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGAAGUUUUUUGUGCUCUGAGUACUCAGCGUCCGUAAGGGAUAUGCUCCGCCAGAGAC
CAACCGAGAA

SEQ ID NO 44 (AMX(84)-B10)
GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGAAGUGCUUCAUGCGGCAAACUGCAUGACGUCGAAUAGAUAUGCUCCGCCAGAGACC
AACCGAGAA

SEQ ID NO 45 (AMX(84)-A11)
GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGAGAGGUAUGUGGUUUUGCCGAGCAACUCGGUGUCAGCCGUCAGCUCCGCCAGAGACC
AACCGAGAA

SEQ ID NO 46 (AMX(84)-F11)
GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGAUGUGCUUGAGUUAAAUCUCAUCGUCCCCGUUUGGGGAUAUGCUCCGCCAGAGACC
AACCGAGAA

SEQ ID NO 47 (AMX(84)-E12)
GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGAAGUUUUUGUGCUCUGAGUACUCAGCGUCCGUAAGGGAUAUGCUCCGCCAGAGACC
AACCGAGAA

SEQ ID NO 48 (AMX(84)-C10)
GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGAGAUGUAUUCAGGCCGUCCGCAUUGAUGUCAGUUAUGCGUAGCUCCGCCAGAGACC
AACCGAGAA

SEQ ID NO 49 (AMX(84)-C11)
GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGAAUGGUCCGAAUCUCUGGCGCCACGCUGAGUAUAGACGGAAGCUCCGCCAGAGACC
AACCGAGAA

SEQ ID NO 50 (AMX(84)-G11)
GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGAGUGCUUCGUAUGUUGAAUACGACGUUCGCAGGACGAAUAUGCUCCGCCAGAGACC
AACCGAGAA

SEQ ID NO 51 (ARX33-plate1-H01)
AGGGAAAAGGAAUCAUACACAAGAUGUAUCAUCGGGUCGUACAAAAGCGCCACGGAACCAUUCGCUCCGCCAGANACCA
ACCGAGAA

SEQ ID NO 52 (AMX(91)-F11)
GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGACGCGUCAGGUCCACGCUGAAAUUUAUUUUCGGCAGUGUAAGCUCCGCCAGAGACC
AACCGAGAA

SEQ ID NO 53 (AMX(91)-G1)
GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGAUAUGUGCCUGGGAUGGACGACAUCCCCUGUCUAAGGAUAUGCUCCGCCAGAGACC
AACCGAGAA

SEQ ID NO 54 (AMX(91)-E3)
GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGAUUACUCCGUUAGUGUCAGUUGACGGAGGGAGCGUACUAUUGCUCCGCCAGAGACC
AACCGAGAA

SEQ ID NO 55 (AMX(91)-H3)
GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGACAUUGUGCUUUAUCACGUGGGUGAUAACGACGAAAGUUAUGCUCCGCCAGAGACC
AACCGAGAA

SEQ ID NO 56 (AMX(91)-B5)
GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGACAGUGUAUGAGGAAGAUUACUUCCAUUCCUGAGCGGUUUUCGCUCCGCCAGAGAC
CAACCGAGAA

SEQ ID NO 57 (AMX(91)-A6)
GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGAUUGGCAAUGUGACCUUCAACCCUUUUCCCGAUGAACAGUGGCUCCGCCAGAGACC
AACCGAGAA

SEQ ID NO 58 (AMX(91)-G7)
GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGACAUGACUGCAUGCUUCGGGAGUAUCUCGGUCCCGACGUUCGCUCCGCCAGAGACC
AACCGAGAA

SEQ ID NO 59 (AMX(91)-H7)
GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGACUUAUGGCCUCAAGGGGGGUAAUAAACCCAGCGUGUGCAUGCUCCGCCAGAGACC
AACCGAGAA

SEQ ID NO 60 (AMX(91)-B8)
GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGAAUCCUGGCUUCGCAUAGUGUAUGGGUAGUACGACAGCGCGUGCUCCGCCAGAGAC
CAACCGAGAA

SEQ ID NO 61 (AMX(91)-H8)
GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGAACGCAUAGUCGGAUUUACCGAUCAUUCUGUGCCUUCGUGACGCUCCGCCAGAGAC
CAACCGAGAA

SEQ ID NO 62 (AMX(91)-G9)

GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGAAUUGUGCUUACAACUUUCGUUGUACGGACGUGUCAGUUAUGCUCCGCCAGAGACC
AACCGAGAA

SEQ ID NO 63 (AMX(91)-D9)
GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGAGUGUAUUACCCCCAACCCAGGGGGACCAUUCGCGUAACAAGCGUCGGCCAGAGACC
AACCGAGAA

SEQ ID NO 64 (AMX(91)-G11)
GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGACUUAACAGUGCGGGGCGCAGUGUAUAGAUCCGCAAUGUGUGCUCCGCCAGAGACC
AACCGAGAA

SEQ ID NO 65 (AMX(91)-C12)
GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGACGAUAGUAUGACCUUUUUGAAAGGCUUCCCGAGCGGUGUUCGCUCCGCCAGAGACC
AACCGAGAA

SEQ ID NO 66 (AMX(91)-H12)
GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGACGUGUGCUUUAUGUAAACCAUAACGUUCCAUAAGGAAUAUGCUCCGCCAGAGACC
AACCGAGAA

[00241] Aquellas secuencias que tienen actividad de unión para las proteínas objetivas IL-23 como se determina por el ensayo de unión dot blot descrito anteriormente, y que es funcional los ensayos basados en células (descrito en el ejemplo 3), se minimiza (descrito adelante en el ejemplo 2).

Ejemplo 1B: selecciones IL-23 contra IL-23 humano con grupos que contienen nucleótido ribo/2'O-Me

[00242] Se desarrollan dos selecciones para identificar aptámeros que contienen nucleótidos ribo/2'O-Metilo. Una selección utiliza 2'O-Metil A, C, y U y 2'OH G (rGmH), y la otra selección utiliza 2'-OMe C, U y 2'-OH G, A (rRmY). Ambas selecciones son selecciones directas contra h-IL-23 que se han inmovilizado sobre una placa hidrófoba. No se toman etapas para la selección de bias de aptámeros específicos para los subdominios p19 o p40. Ambas selecciones producen

grupos significativamente enriquecidos para unión h-IL-23 versus naïve, grupos no seleccionado. Las secuencias de clon individual se reportan aquí, y los datos de unión h-IL-23 se suministran para clones individuales seleccionados.

[00243] Preparación de grupos. Una plantilla de ADN con la secuencia 5'-GGGAGAGGAGAGAACGTTCTACN_{30}CGCTGTCGATCGATCGATCGATG-3' (ARC256) (SEQ ID NO 3) se sintetiza utilizando un sintetizador ABI EXPEDITE™ ADN, y se desprotege por métodos estándar. Las series de N en la plantilla de ADN (SEQ ID NO 3) puede ser cualquier combinación de nucleótidos y da la única región de secuencia de los aptámeros resultantes.

[00244] La plantilla se amplifica con el 5' iniciador 5'-TAATACGACTCACTATAGGGAGAGGAGAGAACGTTCTAC-3' (SEQ ID NO 67) y 3' iniciador 5'-CATCGATCGATCGATCGACAGC-3' (SEQ ID NO 68) y luego utilizada como una plantilla para transcripción *in vitro* con polimerasa de ARN T7 mutante sencilla Y639F. Las transcripciones se hacen a 37°C durante la noche utilizando 200 mM Hepes, 40 mM DTT, 2 mM de espermidina, .01% Triton X-100, 10% PEG-8000, 5 mM $MgCl_2$, 1.5 mM $MnCl_2$, 500 µM NTPs, 500 µM GMP, 0.01 unidades/µL pirofosfatasa inorgánica, y 2 µg/mL de polimerasa T7 mutante sencilla Y639F. Se transcriben dos composiciones diferentes, rGmH, y rRmY.

[00245] selección cada ronda de selección se inicia al inmovilizar 20 pmoles de h- IL-23 a la superficie de placas

hidrófobas Maxisorp Nunc durante dos horas a temperatura ambiente en 100 µL de 1X PBS Dulbecco (DPBS ($+Ca^{2+}$, Mg^{2+})). El supernadante se remueven entonces y los posos se lavan cuatro veces con 120 µL de amortiguador de lavado (1X DPBS, 0.2% BSA, y 0.05% Tween-20). Los grupos de ARN se calientan a 90°C durante tres minutos y se enfría a temperatura ambiente durante 10 minutos hasta refriegue. En la ronda 1, se conduce una selección de etapa positiva. En resumen 1 x 10^{14} moléculas (0.2 nmoles) de grupo de ARN se encuban en 100 µL de amortiguador de unión (1X DPBS y 0.05% Tween-20) en posos con objetivo de proteína inmovilizada durante una hora. El supernadante se remueve entonces y los posos se lavan cuatros veces con 120 µL de amortiguador de lavado. En rondas posteriores se incluyen una etapa de selección negativa. El grupo de ARN también se incuba durante 30 minutos a temperatura ambiente en posos vacíos para remover cualquier secuencia de unión plástica del grupo antes de la etapa de selección positiva. El número de lavadas se incrementa después de la ronda cuatro para incrementar la fuerza. En todos los casa, la unión del grupo de ARN al h-IL-23 inmovilizado se transcribe en forma reversa directamente en la placa de selección por la adición de la mezcla RT (iniciador 3', (SEQ ID NO 68)), y RT Thermoscript™, (Invitrogen, Carlsbad, CA) seguido por incubación a 65°C durante 1 hora.

[00246] el cADN resultante se utiliza como una plantilla para PCR utilizando polimerasa (New England Biolabs, Beverly, MA). Las condiciones PCR "inicio caliente" con una temperatura de hibridación de 60°C que se utiliza para minimizar la formación de dímero-iniciador. El ADN de plantilla de grupo amplificado se desaliniza con una columna Centrisep (Princeton Separations, Adelphia, NJ) de acuerdo con las instrucciones recomendadas por l fabricante, y utilizadas para transcribir el ARN del grupo para la siguiente ronda de selección. El grupo transcripto se purifica con gel sobre un 10% de gel poliacrilamida cada ronda. La tabla 6 muestra la concentración de ARN utilizada por ronda de selección.

[00247] Tabla 6 concentraciones de grupo de ARN por ronda de selección

Ronda	rRmY(grupos de pmoles utilizados)	rGmH (grupos de pmoles utilizados)
1	200	200
2	110	40
3	65	100
4	50	170
5	80	100
6	100	110
7	50	70
8	120	60
9	120	80
10	130	
11	110	

[00248] el progreso de la selección se monitorea utilizando el ensayo de unión de filtro de sándwich dot blot como se describió en el ejemplo 1A. El ARN del grupo 5'-^{32}P etiquetado se repliega a 90°C durante 3 minutos y se enfría a temperatura ambiente durante 10 minutos. Luego, el ARN del grupo (concentración de traza) se incuba con h-IL-23 DPBS más 0.1 mg/mL de tARN durante 30 minutos a temperatura ambiente y luego se aplica a un sándwich de filtro de nailon y nitro celulosa en un aparato dot blot (Schleicher y Schuell). El porcentaje de unión de ARN del grupo a la nitro celulosa se calcula y se monitorea aproximadamente cada tres rondas con una selección de punto único (+/- 250 nM h-IL-23). Se hacen las mediciones del K_D del grupo utilizando titulación de proteína h-IL-23 (R&D, Minneapolis, MN) y el aparato dot blot como se describió anteriormente.

[00249] la selección rRmY h-IL-23 se enriquece para la unión h-IL-23 versus grupo naïve después de cuatro rondas de selección (datos no mostrados). Se incrementa la fuerza de selección y la selección se continua durante 8 rondas mas. En la ronda 9 el K_D del grupo fue aproximadamente 500 Nm o mayor. La selección rGmH se enriquece sobre la unión del grupo naïve en la ronda 10. El K_D del grupo también fue de aproximadamente 500 nM o más. La figura 7 es una curva de unión de la selección de grupo rRmY y rGmH que se une al h-IL-23. Los grupos se clonan utilizando el kit de clonación TOPO TA (Invitrogen, Carlsbad, CA) y se generan las

secuencias individuales y se ensayan para unión. Se desarrolla inicialmente selección de unión de punto único en todas las transcripciones de clon rRmY crudas utilizando una dilución 1:200 dilución, +/- 200 nM IL-23, más 0.1 mg/mL de tARN competidor. Se desarrollan entonces una selección de 10 puntos sobre 24 de los clones rRmY que mostraron la mejor unión en la selección de punto único. Se desarrolla la selección de punto 10 utilizando cero a 480 nM IL-23 en diluciones seriales de 3 pliegues. Se generan las curvas de unión ((KaleidaGraph v. 3.51, Synergy Software) y se estima el K_Ds por el ajuste de los datos a la ecuación: unión de fracción ARN = amplitud de *[h-IL-23]/K_D + [h-IL-23]). La tabla 7 adelante muestra los datos de la secuencia de los aptámeros seleccionados rRmY que muestran afinidad de unión para el h-IL-23. Hay un grupo de 6 secuencia duplicada y 4 pares de 2 secuencias duplicadas de los clones rRmY generados. La tabla 8 muestra las características de unión de los clones rRmY así ensayados. Los clones también se ensayan de 48 transcripciones de clon rGmH crudas en una dilución 1:200 y 0.1 mg/mL de tARN se utiliza como competidor el promedio de unión de sobre el fondo fue de solo cerca de 14%, mientras que el promedio de clones rRmY en el mismo ensayo fue de cerca de 30%, con 10 clones mayor que el 40%. La caracterización de secuencias y unión de los clones rGmH ensayados no se muestran.

[00250] Las secuencias de acido nucleico de los aptámeros rRmY caracterizados en la tabla 7 se dan adelante. La secuencia única de cada aptámero en la tabla 7 comienza en el nucleótido 23, inmediatamente luego de la secuencia GGGAGAGGAGAGAACGUUCUAC (SEQ ID NO 69), y corre hasta que este presenta la secuencia de ácido nucleico fija 3' GCUGUCGAUCGAUCGAUCGAUG (SEQ ID NO 70).

[00251] A menos que se indique otra cosa, las secuencias individuales y listadas adelante se representan en la orientación 5' a 3' y representan las secuencias de los aptámeros que se unen al IL-23 y/o IL- 12 seleccionado bajo las condiciones rRmY SELEX™ en donde las purinas (A y G) son 2'-OH y las pirimidinas (U y C) son 2'-OMe. Cada una de las secuencias listadas en la tabla 7 se puede derivar con porciones de poli alquileno glicol ("PAG") pueden o no contener taponado (por ejemplo, un dT 3' invertido).

[0002] Tabla 7- secuencias rRmY (Ronda 10)

SEQ ID NO 71
GGGAGAGGAGAGAACGUUCUACAAAUGAGAGCAGGCCGAAGAGGAGUCGCUCGCUGUCGAUCGAUCGAUCGAUG

SEQ ID NO 72
GGGAGAGGAGAGAACGUUCUACAAAUGAGAGCAGGCCGAAAAGGAGUCGCUCGCUGUCGAUCGAUCGAUCGAUG

SEQ ID NO 73
GGGAGAGGAGAGAACGUUCUACAAAUGAGAGCAGGCCGAAAAGGAGUCGCUCGCUGUCGAUCGAUCGAUCGAUG

SEQ ID NO 74

GGGAGAGGAGAGAACGUUCUACGGUAAAGCAGGCUGACUGAAAGGUUGAAGUCGCUGUCGAUCGAUCGAUCGAUG

SEQ ID NO 75
GGGAGAGGAGAGAACGUUCUACAGGUUAAGAGCAGGCUCAGGAAUGGAAGUCGCUGUCGAUCGAUCGAUCGAUG

SEQ ID NO 76
GGGAGAGGAGAGAACGUUCUACAACAAAGCAGGCUCAUAGUAAUAUGGAAGUCGCUGUCGAUCGAUCGAUCGAUG

SEQ ID NO 77
GGGAGAGGAGAGAACGUUCUACAACAAAGCAGGCUCAUAGUAAUAUGGAAGUCGCUGUCGAUCGAUCGAUCGAUG

SEQ ID NO 78
GGGAGAGGAGAGAACGUUCUACAAAAGAGAGCAGGCCGAAAAGGAGUCGCUCGCUGUCGAUCGAUCGAUCGAUG

SEQ ID NO 79
GGGAGAGGAGAGAACGUUCUACAAAAGGCAGGCUCAGGGGAUCACUGGAAGUCGCUGUCGAUCGAUCGAUCGAUG

SEQ ID NO 80
GGGAGAGGAGAGAACGUUCUACAAGAUAUAAUUAAGGAUAAGUGCAAAGGAGACGCUGUCGAUCGAUCGAUCGAUG

SEQ ID NO 81
GGGAGAGGAGAGAACGUUCUACGAAUGAGAGCAGGCCGAAAAGGAGUCGCUCGCUGUCGAUCGAUCGAUCGAUG

SEQ ID NO 82
GGGAGAGGAGAGAACGUUCUACGAGAGGCAAGAGAGAGUCGCAUAAAAAAAGACGCUGUCGAUCGAUCGAUCGAUG

SEQ ID NO 83
GGGAGAGGAGAGAACGUUCUACGCAGGCUGUCGUAGACAAACGAUGAAGUCGCGCUGUCGAUCGAUCGAUCGAUG

SEQ ID NO 84
GGGAGAGGAGAGAACGUUCUACGGAAAAAGAUAUGAAAGAAAGGAUUAAGAGACGCUGUCGAUCGAUCGAUCGAUG

SEQ ID NO 85
GGGAGAGGAGAGAACGUUCUACGGAAGGNAACAANAGCACUGUUUGUGCAGGCGCUGUCGAUCNAUCNAUCNAUG

SEQ ID NO 86
GGGAGAGGAGAGAACGUUCUACUAAUGCAGGCUCAGUUACUACUGGAAGUCGCUGUCGAUCGAUCGAUCGAUG

SEQ ID NO 87
AGGAGAGGAGAGAACGUUCUACUAGAAGCAGGCUCGAAUACAAUUCGGAAGUCGCUGUCGAUCGAUCGAUCGAUG

SEQ ID NO 88
GGGAGAGGAGAGAACGUUCUACAUAAGCAGGCUCCGAUAGUAUUCGGCAAGUCGCUGUCGAUCGAUCGAUCGAU

[00252] **Tabla 8 – Datos de unión de clon rRmY IL-23**

SEQ	IL-23 K_D

ID No.	(nM)
72	211.4
83	8.2
86	219.3
80	3786.3
75	479.4
74	257.0
81	303.2
77	258.9
73	101.4
88	101.2
84	602.5
78	123.7
76	77.2
87	122.3
71	124.0
85	239.9
82	198.6
79	806.7

**ensayos desarrollados en 1X DPBS (+Ca^{2+}, Mg^{2+}), 30 minutos de incubación RT

**R&D IL-23 (proteína libre de portador)

EJEMPLO 1C: Selecciones contra IL-23 humano con grupos que contienen nucleótido desoxi/2'O-metilo

[00253] Se desarrolla una selección alternativa para obtener aptámeros estabilizados específicos para IL-23 utilizando desoxi purinas (A y G) y pirimidinas 2'-0-Me (C y U) utilizando la estrategia h-IL-23.

[00254] Preparación de grupos una plantilla de ADN con la secuencia 5'-GGGAGAGGAGAGAACGTTCTACN_{30}CGCTGTCGATCGATCGATCGATG-3' (ARC256, SEQ ID NO 3) se sintetiza utilizando un sintetizador de ADN ABI EXPEDITE™, y se desprotege por métodos estándar. Las series de N en la plantilla de ADN (SEQ ID NO 3) puede ser cualquier combinación de nucleótidos y da la región de secuencia única de los aptámeros resultantes. Las plantillas se amplifican con el iniciador 5', 5'-TAATACGACTCACTATAGGGAGAGGAGAGAACGTTCTAC-3' (SEQ ID NO 67) y el iniciador 3' 5'-CATCGATCGATCGATCGACAGC-3' (SEQ ID NO 89) y luego utilizarla como una plantilla para la transcripción *in vitro* con la polimerasa de ARN T7 mutante sencilla Y639F. se hacen transcripciones a 37°C durante la noche utilizando 200 mM Hepes, 40 mM DTT, 2 mM espermidina, 0.01% Triton X-100, 10% PEG-8000, 9.6 mM $MgCl^2$, 2.9 mM $MnCl^2$, 2 mM NTP, 2 mM GMP, 2 mM espermina, 0.01 unidades/µL de pirofosfatasa inorgánica, y 2 µg/mL de polimerasa T7 mutante sencilla Y639F.

[00255] Selección: cada ronda de selección se inicia al inmovilizar 20 pmoles de h-IL-23 a la superficie de placas hidrófobas Maxisorp Nunc durante una hora a temperatura

ambiente en 100 µL de 1X PBS. Se remueven entonces el supernadante y se lavan los posos 5 veces con 120 µL de amortiguador de lavado (1X PBS, 0.1 mg/mL tARN y 0.1 mg/mL de ADN esperma de salmón ("ssADN")). En la ronda 1, se conduce una etapa de selección positiva: 100 pmoles de ARN de grupo (6×10^{13} moléculas únicas) se incuban 100 µL de amortiguador de unión (1X PBS, 0.1 mg/mL tARN y 0.1 mg/mL ssADN) en los posos con proteína objetivo inmovilizada durante 1 hora. El supernadante se remueve luego y los posos se lavan 5 veces con 120 µL de amortiguador de lavado. En rondas posteriores se incluye una etapa de seleccione negativa. El ARN de los grupos también se incuba durante una hora a temperatura ambiente en posos vacíos para remover cualquier secuencia de unión plástica del grupo antes de la etapa de selección positiva. Partiendo en la ronda 3 se introduce una segunda etapa de selección negativa. Los posos objetivo inmovilizado se bloquean durante una hora a temperatura ambiente en 100 µL de amortiguador de bloqueo (1X PBS, 0.1 mg/mL tARN, 0.1 mg/mL ssADN y 0.1 mg/mL BSA) antes de la etapa de selección positiva. En todos los casos, el grupo de ARN unido para inmovilizar h-IL-23 se transcribe de forma reversa directamente en la placa de selección después de la adición de la mezcla RT (iniciador 3', (SEQ ID NO 89)), y Thermoscript™ RT (Invitrogen, Carlsbad, CA), seguido por incubación a 65°C durante 1 hora. El cADN resultante se utiliza como una plantilla para el PCR (Taq polymerase, New England Biolabs, Beverly, MA). Las condiciones PCR "inicio

caliente" acopladas con una temperatura de hibridación de 68°C se utiliza para minimizar la formación de iniciador-dímero. El ADN de plantilla de grupo amplificado se desaliniza con una columna Micro Bio-Spin (Bio-Rad, Hércules, CA) de acuerdo con las condiciones recomendadas por el fabricante y utilizado para la trascripción del programa del ARN del grupo para la siguiente ronda de selección. El grupo trascripto se purifica con gel sobre un 10% de gel poliacrilamida cada ronda.

[00256] Análisis de unión de proteína se monitorea el progreso de selección utilizando el ensayo de unión de filtro de sándwich previamente descrito en el ejemplo 1A. Se encuba (concentración en traza) ARN del grupo 5'- ^{32} p-etiquetado con h-IL-23, 1X PBS más 0.1 mg/mL tARN, 0.1 mg/mL ssADN y 0.1 mg/mL BSA durante 30 minutos a temperatura ambiente y luego se aplica a nitrocelulosa y sándwich de filtro de nailon en un aparato dot blot (Schleicher and Schuell, Keene, NH). El porcentaje de unión de ARN del grupo a la nitrocelulosa se calcula después de 6,7 y 8 rondas con una selección de 7 puntos con h-IL-23 (0.25 nM, 0.5 nM, 1 nM, 4 nM, 16 nM, 64 nM y 128 nM). Se calculan mediciones del grupo K_D como se describió previamente.

[00257] La selección de dRmY IL-23 se enriquece para la unión h-IL-23 versus el grupo naïven después de 6 rondas de selección. En la ronda 8 el grupo K_D fue de aproximadamente 54

nM o mayor. Los grupos de la ronda 6,7 y 8 se clonan utilizando un kit de clonación TOPO TA (Invitrogen, Carlsbad, CA) y se generan secuencias individuales. La tabla 9 listas las secuencias de los clones dRmY generados de los grupos de las 6,7 y 8. Se desarrolla análisis de unión de proteína para cada clon. Se desarrollan ensayos de unión en 1X PBS +0.1 mg/mL tARN, 0.1 mg/mL de ADN de esperma de salmón, 0.1 mg/mL BSA, durante 30 minutos de incubación a temperatura ambiente. La tabla 10 incluye la caracterización de unión para estas secuencias individuales.

[00258] Las secuencias de ácido nucleico de los aptámeros dRmY caracterizados en la tabla 9 de dan adelante. La única secuencia de cada aptámero de adelante empieza en el nucleótido 23, seguido inmediatamente de la secuencia GGGAGAGGAGAGAACGUUCUAC (SEQ ID NO 69), y corre hasta que esta presenta la secuencia de ácido nucleico 3' GCUGUCGAUCGAUCGAUCGAUG (SEQ ID NO 90).

[00259] A menos que se indique otra cosa, la secuencias individuales listadas adelante se representan en la orientación 5' a 3' y representa la secuencia de los aptámeros que se unen a IL-23 y/o IL-12 seleccionadas bajo las condiciones de dRmY SELEX™ en donde las purinas (A y C) son desoxi y las pirimidinas(U y C) son 2'-OMe. Cada una de las secuencias listadas en la tabla 9 se puede derivar con

porciones de polialquilenglicol ("PAG") y pueden o no contener taponado (por ejemplo, un dT invertido 3').

[00260] Tabla 9 secuencia de clon dRmY IL-23

SEQ ID NO 91 (ARC 489)
GGGAGAGGAGAGAACGUUCUACAUCGCCCGGUGGCGGGCAUUGGGUGGAUGCGCUGUCGAUCGAUCGAUCGAUG

SEQ ID NO 92 (ARC 490)
GGGAGAGGAGAGAACGUUCUACAGCCUUUUGGGUAAGGGCAGGGGUGCCCGGUCCCUGUCGAUCGAUCGAUCGAUG

SEQ ID NO 93
GGGAGAGGAGAGAACGUUCUACGUAACGGGGGUGGGAGGGGCGAACAACUUGACGCUGUCGAUCGAUCGAUCGAUG

SEQ ID NO 94 (ARC 491)
GGGAGAGGAGAGAACGUUCUACAUCGCCCCGUCGGUGGCAUAGGGUGGAUGCGCUGUCGAUCGAUCGAUCGAUG

SEQ ID NO 95
GGGAGAGGAGAGAACGUUCUACGGGCUACGGGGGAUGGAGGGUGGGGUCCCAGACGCUGUCGAUCGAUCGAUCGAUG

SEQ ID NO 96
GGGAGAGUAGAGAACGUUCUACACGGGGUGGGACGGGCCAGUCCCAUGGADCGCUGUCGAUCGAUCGAUCGAUG

SEQ ID NO 97 (ARC492)
GGGAGAGGAGAGAACGUUCUACGCAAUGACCCCCGAGGCUCUGGGAGAG GGCGCUGUCGAUCGAUCGAUCGAUG

[00261] Tabla 10 datos de unión de aptámero dRmY IL-23

ID de SEC No.	IL-23 K_D (nM)	IL-12 K_D (nM)
91	4.0	17.2
92	26.0	37.1
92	184.2	No Ensayado
94	17.1	93.0
95	432.6	No Ensayado
96	209.7	No Ensayado
97	NB	NB

**ensayo desarrollado en 1X PBS + 0.1 mg/mL tARN, 0.1 mg/mL ssADN, 0.1 mg/mL BSA, incubación 30 minutos RT

** R&D IL-23 (proteína libre de portador)

N.B.= unión no detectable

EJEMPLO 1D: Selecciones adicionales contra IL-23 humano con grupos que contienen nucleótido desoxi /2' O-metilo

[00262] Introducción se utilizan tres estrategias de selección para identificar aptámeros para h-IL-23 utilizando un grupo que contiene nucleótidos desoxi/2'O-metilo. Estas selecciones utilizan 2'O-Me C, y U y desoxi A y G. la primera estrategia de selección (dRmY IL-23) fue una selección de dirección contra h-IL-23. En la segunda estrategia de selección (dRmY IL-23/IL-12neg), el h-IL-12 se incluye en la etapa de selección negativa para dirigir el enriquecimiento de la unión de aptámero a P19, el único subdominio para h-IL-23. En la tercera estrategia de selección (dRmY h-IL-23-S), se utiliza fuerza incrementada en la posición de selección al incluir lavados largos para dirigir la selección para escoger aptámeros de alta afinidad. Todas las tres estrategias de selección producen aptámeros para el h-IL-23. Se especifican varios aptámeros para el h-IL-23, y varios muestran reactividad cruzada entre el h-IL-23 y h-IL-12.

[00263] Selección de dRmY: la ronda 1 de la selección dRmY h-IL-23 empezó con $3x10^{14}$ moléculas de un grupo de ARN

480

modificado 2'0-Me C, y U y desoxi A y G modificados con la secuencia 5'-GGGAGAGGAGAGAACGUUCUAC-N30-GGUCGAUCGAUCGAUCAUCGAUG-3' (ARC520) (SEQ ID NO 98), que se sintetiza utilizando un sintetizador de ADN ABI EXPEDITE™, y desproteger de métodos estándar. Las aseries de N en la plantilla (SEQ ID NO 98) puede ser cualquier combinación de nucleótidos y dar la región de secuencia única de los aptámeros resultantes.

[00264] cada ronda de selección se inicia al inmovilizar 20 pmoles de h-IL-23 a la superficie de placas hidrófobas Maxisorp Nunc durante 1 hora a temperatura ambiente en 100 µL de 1X PBS. El supernadante se remueve entonces y los posos se lavan 5 veces con 120 µL de amortiguador de lavado (1X PBS, 0.1 mg/mL tARN y 0.1 mg/mL ADN de esperma de salmón ("ssDNA")). En la ronda 1, se incuban 500 pmoles de ARN de grupo ($3x10^{14}$ moléculas) en 100 µL de amortiguador de unión (1X PBS, 0.1 mg/mL tARN y 0.1 mg/mL ssADN) en el poso con objetivo de proteína inmovilizada durante una hora. El supernadante se remueve entonces y se lava el poso 5 veces con 120 µL de amortiguador de lavado. En rondas posteriores se incluye una etapa de selección negativa en la que el ARN del grupo también se incuba durante una hora a temperatura ambiente en un poso vacío para remover cualquier secuencia de unión plástica del grupo antes de la etapa de selección positiva.

[00265] Partiendo en la ronda 3, se introduce una segunda etapa de selección negativa. El grupo se somete a una hora de incubación en posos objetivos inmovilizados que se bloquean durante una hora a temperatura ambiente con 100 µL de amortiguador de bloqueo (1X PBS, 0.1 mg/mL tARN, 0.1 mg/mL ssADN y 0.1 mg/mL BSA) antes de la etapa de selección positiva (tabla 11A). En la ronda 3, el grupo dRmY h-IL-23 se divide en la selección dRmY h-IL-23/IL-12neg al someter el grupo a una hora adicional de etapa de incubación negativa a temperatura ambiente en un poso que ha sido bloqueado durante una hora a temperatura ambiente con 20 pmoles de h-IL-12 y lavado 5 veces con 120 µL de amortiguador de lavado, que ocurre antes de la incubación positiva de h-IL-23. El grupo se divide en posos h-IL-12 adicionales bloqueados en rondas posteriores para incrementar la fuerza (ver tabla 11B).

[00266] Un método adicional para incrementar la discriminación entre la unión h-IL-23 y h-IL-12 fue agregar el h-IL-12 a la selección positiva junto con el grupo a una baja concentración, en la que los ligadores h-IL-23 específicos se pueden unir al h-IL-23 inmovilizado, y los ligadores h-IL-12 se pueden lavar lejos después de una hora de incubación. La selección de dRmY h-IL-23-s se divide del grupo dRmY h-IL-23 en la ronda 6 con la adición de "fuertes lavados" en la selección positiva, en la que después de una hora de incubación con h-IL-23, se remueve el grupo, luego 100 µL 1X PBS, 0.1 mg/niL tARN, y 0.1 mg/mL ssADN se agrega e

incuba durante 30 minutos (tabla 11C). Este procedimiento de lavado fuerte se remueve y se repite, con la intención de seleccionar las moléculas con alta afinidad.

[00267] En todos los casos, la unión de ARN del grupo para h-IL-23 inmovilizado se transcribe de forma reversa directamente en la placa de selección por la adición de mezcla RT (iniciador 3'5'-CATCGATGATCGATCGATCGAC-3' (SEQ ID NO 100)), y Thermoscript™ RT, (Invitrogen, Carlsbad, CA) seguido por incubación a 65°C durante una hora. El cADN resultante se utiliza como una plantilla para el PCR (20 mM Tris pH 8.4, 50 mM KCl, 2 mM $MgCl^2$, 0.5 µM de iniciador 5' 5'-TAATACGACTCACTATAGGGAGAGGAGAGAACGTTCTAC-3' (SEQ ID NO 99), 0.5 µM de iniciador 3' (SEQ ID NO 100), 0.5 mM cada uno dNTP, 0.05 unidades/µL de polimerasa Taq (New England Biolabs, Beverly, MA)). Se hacen reacciones PCR bajo las siguientes condiciones síquicas: a): 94°C durante 30 segundos; b) 55°C durante 30 segundos; c) 72°C durante 30 segundos. Se repiten los ciclos hasta que se genera suficiente producto PCR. El número mínimo de ciclos requeridos para generar suficiente producto PCR se reporta en las tablas 11A-11C como el "umbral PCR".

[00268] Las plantillas PCR se purifican utilizando un kit de purificación PCR QIAquick (Qiagen, Valencia, CA) y utilizadas para programar la trascripción del ARN del grupo para la siguiente ronda de selección. Se transcriben plantillas

durante la noche a 37°C utilizando 200 mM de Hepes, 40 mM de DTT, 2 mM de espermidina, 0.01% de Triton X-100, 10% PEG-8000, 9.6 mM de $MgCl^2$, 2.9 mM de $MnCl^2$, 2 mM NTP, 2 mM GMP, 2 mM espermina, 0.01 unidades/µL de polifosfatasa inorgánica, y 2 µg/mL de polimerasa T7 mutante sencilla Y639F. Se apagan las reacciones de trascripción con 50 mM de EDTA y etanol precipitado, luego se purifica sobre un 1.5 mM de gel poliacrilamida de desnaturación (8 M urea, 10% acrilamida; 19:1 acrilamida: bisacrilamida). Se remueve el ARN del grupo del gel por elusión pasiva a 37°C entre 300 mM de NaOAc, 20 mM EDTA, seguido por precipitación de etanol. Las condiciones de selección para cada ronda se suministran en las siguientes tablas.

[00269] Tabla 11A: condiciones de selección dRmY hIL-23

IL-23

Ronda #	Conc. grupo ARN (µM)	Conc IL-23 (µM)	pozos neg no tratados	pozos BSA bloqueados neg	Umbral PCR
1	5	0.2	Ninguna	Ninguna	18
2	0.6	0.2	1hr	Ninguna	17
3	0.75	0.2	1hr	1hr	17
4	1	0.2	1hr	1hr	17
5	0.75	0.2	1hr	1hr	17
6	1	0.2	1hr	1hr	15
7	1	0.2	1hr	1hr	15
8	1	0.2	1hr	1hr	16

[00270] Tabla 11B: condiciones de selección dRmY IL-23/IL-12 neg

IL-23/12neg

Ronda #	Conc. grupo ARN (µM)	Conc IL-23 (µM)	pozos neg no tratados	pozos BSA bloqueados neg	Conc. neg IL-12 (µM)	# pozos IL-12	Conc. grupo ARN (µM)	Umbral PCR
1	5	0.2	Ninguna	Ninguna	0	0	0	18
2	0.6	0.2	1hr	Ninguna	0	0	0	17
3	0.75	0.2	1hr	1hr	0.2	1	0	17
4	1	0.2	1hr	1hr	0.2	1	0	17
5	0.75	0.2	1hr	1hr	0.2	2	0	17
6	1	0.2	1hr	1hr	0.2	2	0	15
7	1	0.2	1hr	1hr	0.2	3	0.02	15
8	1	0.2	1hr	1hr	0.2	3	0.05	15

[00271] Tabla 11C: condiciones de selección dRmY hIL-23S

IL-23S

Ronda #	Conc. grupo ARN (µM)	Conc Nitg98a (µM)	pozos neg no tratados	pozos BSA bloqueados neg	# 30min lavadas positivas	Umbral PCR

1	5	0.2	Ninguno	Ninguno	0	18
2	0.6	0.2	1hr	Ninguno	0	17
3	0.75	0.2	1hr	1hr	0	17
4	1	0.2	1hr	1hr	0	17
5	0.75	0.2	1hr	1hr	0	17
6	1	0.2	1hr	1hr	2	15
7	1	0.2	1hr	1hr	2	16
8	1	0.2	1hr	1hr	2	16

[00272] Análisis de Unión de Proteína: Se desarrollan ensayos de unión dot blot a través de las selecciones para monitorear la afinidad de unión de la proteína de los grupos como se describió previamente en el Ejemplo 1A. Cuando se observa un índice positivo significativo de unión de ARN en la presencia de h-IL-23 versus la ausencia de h-IL-23, se clonan los grupos utilizando un kit de clonación TOPO TA (Invitrogen, Carlsbad, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Secuencias similares se ven en todas las tres selecciones de los grupos que se han ido a través de seis rondas, y clones únicos 45 entre las tres selecciones se escogen para selección. Se sintetizan los 45 clones sobre un sintetizador de ADN ABI EXPEDITE™, luego se desprotege por métodos estándar. Los 45 clones individuales se purifican con gel sobre un 10% de gel PAGE, y el ARN se eluye pasivamente en 300 mM de NaOAc y 20 mM de EDTA, seguido por precipitación de etanol.

[00273] Los clones se etiquetan en el extremo 5' con ATP γ-^{32}P, y se ensayan para unión IL-23 y IL-12 en una selección dot blot de 3 puntos (0 nM, 20 nM, y 100 nM h-IL-23; 0 nM, 20 nM, y 100 nM h-IL-12) (datos no mostrados). Los clones que muestran unión no significativa en las condiciones de proteína 20 nM y 100 nM para ambos IL-23 y IL-12 se ensaya adicionalmente para determinación de K_D utilizando una titulación de proteína que va de 0 nM a 480 nM (diluciones de 3 pliegues) en el ensayo dot blot previamente descrito. Los valores K_D se determinan al ajustar una ecuación que describe un complejo de proteína: ARN 1:1 para los datos resultantes (unión de fracción de aptámero = amplitud*([IL-23]/(KD + [IL-23])) + unión de fondo) (KaleidaGraph v. 3.51, Synergy Software). Los resultados de la caracterización de unión de proteína para los clones de alta afinidad se tabulan en la Tabla 13, y las secuencias de clon correspondiente se listan en la tabla 12.

[00274] Las secuencias de ácido nucleico de aptámeros dRmY caracterizados en la tabla 12 se dan adelante. La secuencia única de cada aptámero empieza adelante en el nucleótido 23, seguido inmediatamente de la secuencia GGGAGAGGAGAGAACGUUCUAC (SEQ ID NO 101), y corre hasta que este presenta la secuencia de ácido nucleico 3' GUCGAUCGAUCGAUCAUCGAUG (SEQ ID NO 102).

[00275] A menos que se indique otra cosa, las secuencias individuales listadas adelante se representan en la orientación 5′ a 3′ y representan las secuencias de los aptámeros que se unen al IL-23 y/o IL-12 seleccionados bajo las condiciones en donde las purinas (A y G) son desoxi y las pirimidinas (C y U) son 2′-Ome. Cada una de las secuencias listadas en la Tabla 12 se pueden derivar con porciones de polialquielenglicol ("PAG") y pueden o no contener taponadores (por ejemplo, un dT invertido 3′).

[00275] Tabla 12: secuencias de clon dRmY

SEQ ID NO 103 (ARC611)
GGGAGAGGAGAGAACGUUCUACAGGCAAGGCAAUUGGGGAGUGUGGGUGGGGGGUCGAUCGAUCGAUCAUCGAUG

SEQ ID NO 104 (ARC612)
GGGAGAGGAGAGAACGUUCUACAGGCAAGUAAUUGGGGAGUGCGGGCGGGGGGGUCGAUCGAUCGAUCAUCGAUG

SEQ ID NO 105 (ARC614)
GGGAGAGGAGAGAACGUUCUACAAGGCGGUACGGGGAGUGUGGGUUGGGGCCGGUCGAUCGAUCGAUCAUCGAUG

SEQ ID NO 106 (ARC616)
GGGAGAGGAGAGAACGUUCUACGAUAUAGGCGGUACGGGGGGAGUGGGCUGGGGUCGAUCGAUCGAUCAUCGAUG

SEQ ID NO 107 (ARC620)
GGGAGAGGAGAGAACGUUCUACAGGAAAGGCGCUUGCGGGGGUGAGGGAGGGGUCGAUCGAUCGAUCAUCGAUG

SEQ ID NO 108 (ARC621)
GGGAGAGGAGAGAACGUUCUACAGGCGGUUACGGGGGAUGCGGGUGGGACAGGUCGAUCGAUCGAUCAUCGAUG

SEQ ID NO 109 (ARC626)
GGGAGAGGAGAGAACGUUCUACAGGCAAGUAAUUGGGGAGUGCGGGCGGGGGGUCGAUCGAUCGAUCAUCGAUG

SEQ ID NO 110 (ARC627)
GGGAGAGGAGAGAACGUUCUACAGGCAAGUAAUUGGGGAGUGCGGGCGGGGUCGAUCGAUCGAUCAUCGAUG

SEQ ID NO 111 (ARC628)
GGGAGAGGAGAGAACGUUCUACAGGCAAGGCAAUUGGGGAGCGUGGGUGGGGGGGUCGAUCGAUCGAUCAUCGAUG

SEQ ID NO 112 (ARC632)
GGGAGAGGAGAGAACGUUCUACAAUUGCAGGUGGUGCCGGGGGUUGGGGGCGGGUCGAUCGAUCGAUCAUCGAUG

SEQ ID NO 113 (ARC635)
GGGAGAGGAGAGAACGUUCUACAGGCUCAAAAGAGGGGGAUGUGGGAGGGGGUCGAUCGAUCGAUCAUCGAUG

SEQ ID NO 114 (ARC642)
GGGAGAGGAGAGAACGUUCUACAGGCGCAGCCAGCGGGGAGUGAGGGUGGGGGUCGAUCGAUCGAUCAUCGAUG

SEQ ID NO 115 (ARC643)
GGGAGAGGAGAGAACGUUCUACAGGCCGAUGAGGGGGAGCAGUGGGUGGGGGGGUCGAUCGAUCGAUCAUCGAUG

SEQ ID NO 116 ARC644)
GGGAGAGGAGAGAACGUUCUACUAGUGAGGCGGUAACGGGGGGUGAGGGUGGGGUCGAUCGAUCGAUCAUCGAUG

SEQ ID NO 117 (ARC645)
GGGAGAGGAGAGAACGUUCUACAGGUAGGCAAGAUAUUGGGGGAAGCGGGUGGGGUCGAUCGAUCGAUCAUCGAUG

SEQ ID NO 118 (ARC 646)
GGGAGAGGAGAGAACGUUCUACACAUGGCUCGAAAGAGGGGCGUGAGGGUGGGGUCGAUCGAUCGAUCAUCGAUG

[00277] Tabla 13: Resumen de unión de clon dRmY

SEQ ID NO	ARC #	Selección	K_D hIL-23 (nM)	K_D hIL-12 (nM)
103	ARC611	R7 hIL-23/12neg	21.3	123.1
104	ARC612	R7 hIL-23/12neg	5.8	41.7
105	ARC614	R7 hIL-23/12neg	3.1	54.4
106	ARC616	R7 hIL-23/12neg	13.1	52.1
107	ARC620	R7 hIL-23/12neg	44.8	178.7
108	ARC621	R7 hIL-23/12neg	28.8	111.9
109	ARC626	R7 hIL-23S	10.1	69.8
110	ARC627	R7 hIL-23S	7	79.5
111	ARC628	R7 hIL-23S	57.8	146.5
112	ARC632	R7 hIL-23S	19.1	63.9
113	ARC635	R7 hIL-23S	171.5	430.9
114	ARC642	R7 hIL-23	37.2	188.3
115	ARC643	R7 hIL-23S	71.6	309.4
116	ARC644	R7 hIL-23	34.5	192.9
117	ARC645	R7 hIL-23	33.5	137.3
118	ARC646	R7 hIL-23	207.9	382.6

*30 min de incubación para determinación K_D en ensayo dot blot
*1X PBS +0.1 mg/ml tARN, ADN de esperma de salmón, amortiguador de BSA

Resumen de Selecciones de Aptámero IL-23 Humana

[00278] Las diferentes estrategias y condiciones de selección para el IL-23 SELEX™ produjo varios aptámeros, estabilizados y/o minimizados, que tienen diferentes características de unión. Los aptámeros rRfY seleccionados tienen afinidades aproximadamente en el rango de 15nM a 460 nM, y antes que cualquier optimización post- SELEX™, tiene potencia celular con IC_{50} aproximadamente en el rango de 50nM a 5µg. Estas se pueden minimizar adicionalmente con ganancia apropiada en las características de unión y se espera que muestren potencia incrementada en ensayos basados en células. Estos aptámeros también muestran gran distinción entre el IL-23, que tiene una discriminación cien veces mayor de IL-23 a Il-12.

[00279] Los aptámeros obtenidos bajo las condiciones de selección rRmY tienen afinidades que varían desde aproximadamente 8nM a 3µ. Sin embargo, su potencia celular es menor que la potencia del aptámero rRfY. Para las construcciones rGmH se hace un punto de selección sencillo, pero no se lleva ninguna adicional debido a su alcance de unión sobre el fondo que no fue tan bueno como los clones rRmY. Se utilizan 48 transcripciones de clon rGmH crudas en una dilución 1:200 y 0.1 mg/mL tARN utilizadas como competidor. El promedio de unión sobre el fondo fue de solo aproximadamente 14%, mientras que el promedio del clon rRmY en el mismo ensayo fue de cerca del 30% con 10 clones mayor del 40%.

[00280] El dRmY selecciona aptámeros que tienen diferentes rangos de afinidades en el rango de ~3 nM a ~200nM, y antes de cualquier optimización post SELEX™, que muestran una destacada potencia celular con IC_{50} en el rango de de ~50nM a 500~nM (descrito en el ejemplo 3 adelante). Alguno de estos aptámeros también tienen una distinción de aproximadamente 4 veces para el IL-23 a IL-12, que se puede mejorar luego de optimización adicional.

EJEMPLO 1E: Selecciones contra ("m")-IL-23 de ratón con grupos que contienen 2'-F pirimidina (rRfY)

[00281] Introducción: Se utilizan dos estrategias de selección para identificar a mIl-23 que utiliza un grupo que consiste de purina 2'-OH y nucleótidos 2'-F pirimidina (composición rRfY). La primera estrategia de selección (mIl-23) fue una selección directa contra mIl-23. La segunda estrategia de selección (mIL-23S) fue una selección más fuerte, en la que las rondas iniciales tuvieron menores concentraciones de ARN y proteína en un intento por dirigir la selección hacia ligadores de afinidad mayores. Ambas estrategias de selección producen aptámeros para mIl-23.

[00282] Selección: Dos selecciones (mIL-23 y mIL-23S) empiezan con la incubación de $2x10^{14}$ moléculas de grupo de pirimidina modificado 2'F con la secuencia 5' GGAGCGCACUC

AGCCAC-N40-UUUCGACCUCUCUGCUAGC 3' (ARC275) (SEQ ID NO 119),que incluye una punta de grupo etiquetado de ATP $5'\gamma^{32}$, con IL-23 de ratón (aislado en jaula). Las series de N en la plantilla (ID de SEC No.ID NO 119) pueden ser cualquier combinación de nucleótidos y dar la única región de secuencia de los aptámeros resultantes.

[00283] En la ronda 1 de la selección mI1-23, se incuba el ARN de grupo con 50 pmoles de proteína en un volumen final de 100µL durante 1 hr a temperatura ambiente. En la ronda 1 de la selección mIL-23S, el ARN de grupos se incuba con 65 pmoles de mIL-23 en un volumen final de 1300µL durante un hr a temperatura ambiente. Se desarrollan selecciones en amortiguador 1X PBS. Complejos ARN: mIL-23 y moléculas de ARB libres se separan utilizando 0.45 µL de columnas de giro de nitro celulosa de Schleicer & Schuell (Keene, NH). Las columnas se prelavan con un mL de 1X PBS, y luego las soluciones que contienen ARN: proteínas se agregan a las columnas y se hilan en una centrífuga a 2000 rpm durante 1 minuto. Se desarrolla lavado con amortiguador para remover ligadores no específicos de los filtros (ronda 1, 2x500µL PBS; en rondas posteriores, más lavados fuertes de número y volumen incrementado para enriquecer ligadores específicos), luego los complejos de ARN: proteína unidos a los filtros se eluyen con 200µL lavados (2x100µL lavados en rondas posteriores) de amortiguador de dilución (7M urea 100 mM de acetato de sodio, 3mM EDTA, precalentado a 90°C). Se

precipita el ARN eluado (40 glycogen, 1 volumen isopropanol). El ARN se transcribe de forma reversa con el sistema RT-CPR Thermoscript ™ (Invitrogen, Carlsbad, CA) de acuerdo con instrucciones del fabricante, utilizando el iniciador 3'5 'GCTAGCAGAGAGGTCGAAA 3' (SEQ ID NO 121), seguido por amplificación PCR (20mM Tris pH 8,4 50 mM KCl, 2mM $MgCl_2$, 0.5 µM de iniciador 5' prima 5'TAATACGACTCACTATAGGAGCGCACTCAGCCAC 3' (SEQ ID NO 120), 0.5 µM de iniciador 3' prima (SEQ ID 121), 0.5 mM cada dNTP, 0.05 unidades/µL de polimerasa Taq (New England Biolabs, Beverly, MA)). Las reacciones PCR se hacen bajo las siguientes condiciones de ciclización: a) 94°C durante 30 segundos; b) 60°C durante 30 segundos; c) 72°C durante 30 segundos. Los ciclos se repiten hasta que se genera suficiente producto PCR. El número mínimo de ciclos requeridos para generar suficiente producto PCR se reporta en la tabla 14 como "umbral PCR".

[00284] Se purifican las plantillas PCR utilizando el kit de purificación PCR QIAquick. Se transcriben plantillas utilizando etiquetado de cuerpo GTP $\alpha^{32}P$ durante la noche a 37oC (4%PEG-8000, 40mM (4% PEG-8000, 40 mM Tris pH 8.0, 12 mM MgCl2, 1 mM de espermidina, 0.002 % Triton X-IOO, 3 niM 2'OH purina, 3 mM 2'F pirimidina, 25 niM DTT, 0.25 unidades/100 µL pirofosfatasa inorgánica, 2 µg/mL T7 Y639F polimerasa de ARN mutante sencilla, 5uCi $\alpha^{32}P$ GTP).

[00285] Se repiten rondas posteriores utilizando el mismo método como para el mismo método de la ronda 1, pero con la adición de una etapa de selección negativa. Antes de la incubación con la proteína objetivo, el ARN de grupo se pasa a través de una columna de filtro de nitrocelulosa de 0.45 micrones para remover las secuencias de unión de filtro, luego el filtrado se lleva a cabo en una etapa de selección positiva. En rondas alternas el ARN de grupo se purifica con gel. Se apagan las reacciones de transcripción con 50 mM EDTA y etanol precipitado luego purificado geles de poliacrilamida sobre geles de poliamida de desnaturalización de 1.5 mM (8 m urea, 10% acrilamida, 19:1 de acrilamida: bisacrilamida). Se remueve el ARN de grupo del gel por elusión pasiva en 300mM de NaOAC, de 20mM EDTA, seguido por precipitación de etanol con la adición de 300mM de acetato de sodio y 2.5 volúmenes de etanol.

[00286] El ARN permanece en exceso de la proteína a través de las selecciones (~1 µM ARN). La concentración de proteína se decanta para variar las concentraciones inferiores basadas en la selección particular. Se agrega competidor de TARN a las reacciones de unión en 0.1 µg/mL partiendo en la ronda 2 o 3, dependiendo de la selección. Se completa un total de 7 rondas con ensayo de unión desarrollado en las rondas seleccionadas. La tabla 14 contiene los detalles de la selección que incluyen concentración de ARN de grupo, concentración de proteína, y concentración de tARN utilizada

para cada ronda. Los valores de elusión (índice de valores CPM de ARN a proteína versus ARN total, se pasa luego a través de columna de filtros) junto con los ensayos de unión se utilizan para monitorear el progreso de la selección.

[00287] **Tabla 14**: condiciones de selecciones rRfY mIL-23

1. rRfY mIL-23

Ronda #	clon ARN grupo (µM)	conc Proteína (nM)	Neg	TARN (mg/mL)	%elución	PCR Umbral
1	3.3	500	Ninguno	0	2.64	8
2	1	500	Ninguno	0.1	4.24	8
3	~1	200	Filtro	0.1	0.73	10
4	1	200	Filtro	0.1	3.71	8
5	~1	100	Filtro	0.1	0.41	10
6	1	100	Filtro	0.1	9.27	8
7	~1	100	Filtro	0.1	0.87	9

2. rRtY mIL-23S (fuerte)

Ronda #	clon ARN grupo (µM)	conc Proteína (nM)	Neg	TARN (mg/mL)	%elución	Umbral PCR
1	0.25	50	Ninguno	0	2.79	8
2	0.1	50	filtro	0	4.14	8
3	~1	50	Filtro	0.1	0.16	11
4	1	50	Filtro	0.1	2.57	8

5	~1	25	Filtro	0.1	0.42	10
6	0.8	25	Filtro	0.1	10.29	8
7	~1	25	Filtro	0.1	0.13	10

[00288] Análisis de unión de proteína rRfY mI1-23: Se desarrollan ensayos de unión Dot blot a través de las selecciones para monitorear la afinidad de unión de proteína de los grupos como se describió previamente. Cuando un nivel significante de unión de ARN en la presencia del mIL-23 se observa, se clonan los grupos utilizando un kit de clonación TTOPO TA (Invitrogen, Carlsbad, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para ambas selecciones mIL-23, se clonan plantillas de grupo de ronda 7, y 16 clones individuales para cada selección se ensayan utilizando una titulación de 8 puntos mI1-23. 7 de los 32 clones seleccionados tienen curvas de unión específica y se listan adelante en la tabla 16. La tabla 15 lista las secuencias correspondientes. Todas las otras curvas de unión no específicas desplegadas son similares al grupo no seleccionado. Clones con alta afinidad para el mIL-23 se seleccionan posteriormente para unión de proteína contra iL-12 de ratón IL-23 humanos y IL-12 humano de la misma forma.

[00289] Las secuencias de ácido nucleicos de los aptámeros rRfY caracterizados en la tabla 15 se dan adelante. La secuencia única de cada aptámero comienza adelante en el nucleótido 18, inmediatamente luego de la secuencia

GGAGCGCACUCAGCCAC (SEQ ID NO 122), y corre hasta que esta muestra la secuencia de ácido nucleico fija 3' UUUCGACCUCUCUGCUAGC (SEQ ID NO 123).

[00290] A menos que se indique otra cosa, las secuencias individuales listadas adelante se representan en la orientación 5' a 3'y representan las secuencias que unen al IL-23 de ratón seleccionada bajo las condiciones rRfY SELEX™ en donde las purinas (A y G) son 2'-OH y las pirimidinas (C y U) son 2'-fluoro. Cada una de las secuencias listadas en la tabla 15 se pueden derivar con porciones de polialquilenglicol ("PAG") y pueden o no contener (por ejemplo, a 3'-invertido dT).

[00291] **Tabla 15**: Secuencias de clon mIL-23 rRfY

SEQ ID NO 124 (ARC1628)
GGAGCGCACUCAGCCACAGGUGGCUUAAUACUGUAAAGACGUGCCGCGCAGAGGGAUUUUCGACCUCUCUCUGCUAGC

SEQ ID NO 125 (ARC1629)
GGAGCGCACUCAGCCACCGUAAUUCACAAGGUGCCUGAGUGCAGGGUUGUAUGUUUUUUUCGACCUCUCUCUGCUAGC

SEQ ID NO 126 (ARC1630)
GGAGCGCACUCAGCCACUCUACUCGAUAUAGUUUAUCGAGCCGGUGGUAGAUUAUGAUUUUCGACCUCUCUCUGCUAGC

SEQ ID NO 127 (ARC1631)
GGAGCGCACUCAGCCACGCCUACAAUUCACUGUUAUAUAUCGAAUUAUAGCCCUGGUUUCGACCUCUCUCUGCUAGC

SEQ ID NO 128 (ARC1632)
GGAGCGCACUCAGCCACCGGCUUAAUAUCCAAUAGGAACGUUCGCUCUGAGCAGGCGUUUCGACCUCUCUCUGCUAGC

SEQ ID NO 129 (ARC1633)
GGAGCGCACUCAGCCACAGCUCGGUGGCUUAAUAUCUAUGUGAACGUUCGCAACAGCUUUCGACCUCUCUCUGCUAGC

SEQ ID NO 130 (ARC1634)
GGAGCGCACUCAGCCACCUUGGGCUUAAUACCUAUCGGAUGUGCCCUAGCACGGAAUUUCGACCUCUCUCUGCUAGC

[00292] **Tabla 16** Actividad de unión de clon mIL-23 rRfY

SEC ID NO	Nombre de clon	Selección	Kd mIL-23 (nM)	Kd mIL-12 (nM)	Kd hIL-23 (nM)	Kd hIL-12 (nM)
124	ARC1628	R7 mIL-23	2	6	52	161
125	ARC1629	R7 mIL-23	34	103	31	75
126	ARC1630	R7 mIL-23S	14	18	65	239
127	ARC1631	R7 mIL-23S	33	72	39	69
128	ARC1632	R7 mIL-23S	13	16	91	186
129	ARC1633	R7 mIL-23S	17	44	79	195
130	ARC1634	R7 mIL-23S	3	29	39	63

*30 min RT de incubación para determinación K_D

*1X PBS 0.1 mg/mL de amortiguador de reacción BSA

EJEMPLO 1F: Selecciones para aptámeros IL-23 de ratón con especificidad contra IL-12 de ratón

[00293] Introducción. Se desarrolla una selección para identificar aptámeros para IL-23 de ratón (mIL-232) con especificidad contra IL-12 de ratón (mIL-12). Esta selección se divide de la selección rRfY mIL-23S descrita en la selección anterior partiendo en la ronda 3. Esta selección produce aptámeros para el mIL-23 que tiene especificidad ~3-5-veces sobre mIL-12. Selección mIL-23S/mIL-12 rRfY. Para obtener aptámeros IL-23 de ratón con especificidad contra IL-

12 de ratón, el IL-12 de ratón se incluye dentro de una selección negativa , similar a la proteína en selección negativa (PN-IL-23) descrita anteriormente en el ejemplo 1A. El ARN resultante de la ronda 2 de la selección mIL-23S descrita en el ejemplo IE anterior se utiliza para iniciar la selección R3PN IL-23/12 NEG, en la que el mIL-12 se incluye en una etapa negativa de selección. 9 rondas de selección se desarrollan, con ensayos de unión ejecutados en las rondas seleccionadas. La tabla 17 resume las condiciones de selección que incluyen concentración de ARN de grupo, concentración de proteína, y concentración tARN utilizada para cada ronda. Los valores de elusión (índice de valores CPM de ARN unido a proteína versus total de ARN luego a través de la columna de filtros) junto con ensayos de unión se utilizan para monitorear el progreso de la selección.

Ronda #	conc de grupo ARN (μM)	Conc Proteína (nM)	neg	TARN (mg/mL)	Neg mIL12 conc (nM)	% elusión	Ciclo PCR #
1	0.25	50	Ninguno	0	0	2.79	8
2	0.1	50	Flitro	0	0	4.14	8
3	~1	500	Filtro/IL12	0.1	250	1.33	10
4	1	500	Filtro/IL12	0.1	500	1.68	8
5	1	250	Filtro/IL12	0.1	250	0.89	9
6	1	200	Filtro/IL12	0.1	200	1.47	8
7	1	150	Filtro/IL12	0.1	150	1.39	8
8	1	150	Filtro/IL12	0.1	150	3.73	8
9	1	150	Filtro/IL12	0.1	150	2.98	8

Selección de amortiguador: 1X PBS

*1hr incubación positiva

[00295] Análisis de unión de proteína rRfY mIL-23/S/mIL-12 NEG. Se ejecuta el ensayo de unión Dot blot previamente escrito a través de la selección para monitorear la afinidad de unión de proteína del grupo. Se combina el ARN de traza ^{32}P etiquetada con mIL-23 o mIL-12 e incuban a temperatura ambiente durante 30 min en 1X PBS + 0.1mg/mLBSA para un volumen final de 30 µL la reacción se agrega a un aparato Dot blot (Schleicher and Schuell Minifold-1, dot blot, Acrilyc). Se generan curvas de unión como se describió en las secciones anteriores. Cuando un nivel significativo de unión de ARN en la presencia de mIL-23 se observa, el grupo se clona utilizando el kir de clonación TOPO TA (invitrogen, Carlsbad, CA) de acuerdo con instrucciones del fabricante. Se clona la plantilla del grupo de ronda 9, y 10 clones individuales de la selección se ensayan en titulación dot blot de 8 puntos contra mIL-23. Los clones que se unen significativamente al mIL-23 se seleccionan luego para unir al mIL-12. La tabla 18 resume la caracterización de unión de proteína de los clones de unión. 4 de los 10 clones totales se seleccionan para unión al mIL-12. La tabla 18 resume la caracterización de unión de proteína de los clones de unión. 4 de los 10 clones totales se seleccionan para unión especificamente al mIL-23 y mIL-12 en afinidades variantes. Todos los otros clones exhiben curvas de unión no específicas similares al grupo no seleccionado. Las secuencias para los 4 clones de unión se alistan en la tabla 19 adelante.

[00296] **Tabla 18**: Actividad de unión de clon rRfY mIl-23S/mIl-12 neg

SEQ ID NO	Nombre de clon	K_D mIL-23 (nM)	K_D mIL-12 (nM)
131	AMX369.F1	63	165
132	AMX369.H1	23	194
133	AMX369.B2	49	252
134	AMX369.G3	106	261

*30 min RT determinación de incubación por K_D

*IX PBS + 0.1 mg/mL BSA reacción

[00297] Las secuencias de ácido nucleico de los aptámeros rRfY caracterizados en la tabla 19 se dan adelante. La única secuencia de cada aptámero comienza adelante en el nucleótido 18, inmediatamente luego de la secuencia GGAGCGCACUCAGCCAC (ID de SEC No.: ID NO 122) y corre hasta que esta presenta la secuencia de ácido nucleico fija 3' UUUCGACCUCUCUCUGCUAGC (ID de SEC NO ID NO 123).

[00298] A menos que se indique otra cosa, las secuencias individuales listadas adelante, se representan en la orientación 5' a 3'y representan las secuencias que se unen al IL-23 de ratón seleccionado bajo condiciones rRfY SELX™ en donde las purinas (A y G) son 2' -OH y las pirimidinas (U y C) son 2'-fluoro. Cada una de las secuencias listadas en la tabla 19 se puede derivar con porciones polialquilenglicol

("PAG") y pueden o no contener taponadores (por ejemplo, un dT invertido 3').

[00299] **Tabla 19** Información de secuencia rRfY mIL-23/mIL-12 neg

SEQ ID NO 131 (AMX(369)_F1)

GGAGCGCACUCAGCCACGGUUUACUUCCGUGGCAAUAUUGACCUCNCUCUAGACAGGUUUCGACCUCUCUGCUAGC

SEQ ID NO 132 (AMX(369)_H1) (ARC 1914)

GGAGCGCACUCAGCCACCUGGGAAAAUCUGGGUCCCUGAGUUCUAACAGCAGAGAUUUUUCGACCUCUCUGCUAGC

SEQ ID NO 133 (AMX(369)_B2)

GGAGCGCACUCNGCCACUUCGGAAUAUCGUUGUCUUCUGGGUGAGCAUGCGUUGAGGUUUCNACCUCUCUGCUAGC

SEQ ID NO 134 (AMX(369)_G3)

GGAGCGCACUCAGCCACUGGGGAACAUCUCAUGUCUCUGACCGCUCUUGCAGUAGAAUUUNGACCUCUCUGCUAGC

EJEMPLO 2: COMPOSICIÓN Y OPTIMIZACIÓN DE SECUENCIAS Y SECUENCIAS

EJEMPLO 2 A: Minimización

[00300] Luego de una selección exitosa y luego de la determinación de secuencias de aptámeros, en adición a la determinación de funcionalidad in vitro, se minimizan las secuencias para obtener una secuencia de oligonucleótido más corta que retiene la especificidad de unión a su objetivo propuesto pero ha mejorado las características de unión, tal como K_D mejorado y/o IC_{50}.

Ejemplo 2A 1 minimización de clones rRfY

[00301] Los clones parientes de unión de la selección rRfY descrita en el ejemplo 1A cae en dos familias principales de aptámeros referidos como tipo 1 y tipo 2. La figura 8A y 8B muestra ejemplos de las secuencias y predice configuraciones de estructuras secundarias de tipo 1 y tipo 2. La figura 9ª y 9B muestra las secuencias de aptámero minimizadas y predice las configuraciones secundarias para los tipos 1 y 2.

[00302] Sobre la base de análisis de unión IL-23 descrita en el ejemplo 1 anterior y los datos de ensayo basados en células descritos en el ejemplo 3 adelante, varios clones de tipo 1 de la selección rRfY PN-Il-23 que incluye AMX84-A10 (SEQ ID NO 43), AMX84-B10 (SEQ ID NO 44), y AMX84-F11 (SEQ ID NO 46) se escogen para caracterización adicional. Los oligonucleótidos de construcción de ADN minimizados se transcriben, se purifican con gel, y se prueban en ensayos dot blot para unión al H-IL-23.

[00303] Los clones minimizados A10 min5 (ID de SEC ID NO 139), A10 min 6 (SEQ ID NO 140) se basan en AMX84-A10 (SEQ ID NO 43), los clones minimizados B10min4 (SEQ ID NO 144), y B10min5 (SEQ ID NO 145) se basan en AMX84-B10 (SEQ ID NO 44), y el clon minimizado Fl lmirώ (SEQ ID NO 147), se basan en AMX84-F11 (SEQ ID NO 46). (Figura 9A). Los clones fueron de extremo 5' etiquetados con ATP gamma -32 P. y se ensayaron en ensayos dot blot para determinación K_d utilizando el mismo método como para los clones parientes. Todos tuvieron unión

de proteína significativa (resumida en la tabla 21), y cada uno fue más potente que los parientes respectivos de los cuales ellos se derivan cuando se prueban en ensayos basados en pruebas como se discute en el ejemplo 3 adelante.

[00304] Adicionalmente, las construcciones minimizadas de ejemplo de los aptámeros tipo 1 y tipo 2 se hacen y se ensayan basados en secuencias con censo del aptámero tipo 1 y 2. Tipo 1.4 (SEQ ID NO 151) , y tipo 1.5 (SEQ ID NO 152)son dos ejemplos de tales construcciones minimizadas basadas en la secuencia de familia tipo1, que exhiben alta afinidad de unión IL-23 y la actividad más potente en el ensayo basado en células descrito en el ejemplo 3, comparado con otros minímeros del tipo 1 descritos anteriormente.

[00305] Las secuencias de minímeros rRfY resultantes se listan en la tabla 20 adelante. La tabla 21 muestra los datos de unión de minímero para los minímeros listados en la tabla 20.

[00306] Para los aptámeros rRfY minimizados descritos en la tabla 20 adelante, las purinas (A yG) son purinas 2'-1H y las pirimidinas (C y U) son pirimidinas -fluoro. A menos que se indique otra cosa, las secuencias individuales se representan en orientación 5' a 3'. Cada una de las secuencias listadas en la tabla 20 se puede derivar con porciones de

alquilenglicol("PAG") y pueden o no contener taponadores (por ejemplo, un dt invertido 3').

[00307] Tabla 20 - secuencias de aptámero minímero PN -Il-23 2'F (rRfY)

SEQ ID NO 135 (A10.min1)
GGAGAUCAUACACAAGAAGUUUUUUUGUGCUCUGAGUACUCAGCGUCCGUAAGGGAUCUCC

SEQ ID NO 136 (A10.min2)
GGAGUCUGAGUACUCAGCGUCCGUAAGGGAUAUGCUCCGCCAGACUCC

SEQ ID NO 137 (A10.min3)
GGAGUUACUCAGCGUCCGUAAGGGAUAUGCUCCGACUCC

SEQ ID NO 138 (A10.min4)
GGAGUCUGAGUACUCAGCGUCCCGAGAGGGGAUAUGCUCCGCCAGACUCC

SEQ ID NO 139 (A10.min5)
GGAGCAUACACAAGAAGUUUUUUUGUGCUCUGAGUACUCAGCGUCCGUAAGGGAUAUGCUCC

SEQ ID NO 140 (A10.min6)
GGAGUACGCCGAAAGGCGCUCUGAGUACUCAGCGUCCGUAAGGGAUACUCC

SEQ ID NO 141 (B10.min1)
GGAGCGAAUCAUACACAAGAAGUGCUUCAUGCGGCAAACUGCAUGACUUCGAAUAGAUAUGCUCC

SEQ ID NO 142 (B10.min2)
GGAUCAUACACAAGAAGUGCUUCAUGCGGCAAACUGCAUGACGUCGAAUAGAUCC

SEQ ID NO 143 (B10.min3)
GGAUCAUACACAAGAAGUGCUUCACGAAAGUGACGUCGAAUAGAUCC

SEQ ID NO 144 (B10.min4)
GGAGCAUACACAAGAAGUGCUUCAUGCGGCAAACUGCAUGACGUCGAAUAGAUAUGCUCC

SEQ ID NO 145 (B10.MIN5)
GGAGUAGACAAGAAGUGCUUCCGAAAGGACGUCGAAUAGAUACUCC

SEQ ID NO 146 (F11.min1)
GGUUAAAUCUCAUCGUCCCCGUUUGGGGAU

SEQ ID NO 147 (F11.min2)
GGACAUACACAAGAUGUGCUUGAGUUAAAUCUCAUCGUCCCCGUUUGGGGAUAUGUC

SEQ ID NO 148 (Type 1.1)
GGCAUACACGAGAGUGCUCGUCGAAAGACUCGGCCGAGAGGCUAUGCC

SEQ ID NO 149 (Type1.2)
GGCAUACGCGAGACGCUGGCGAAAGCCUCGGCCGAGAGGCUAUGCC

SEQ ID NO 150 (Type1.3)
GGAUACCCGAGAGGGCUGGCGAAAGCCUCGGCGAGAGCUAUCC

SEQ ID NO 151 (Type1.4)
GGGUACGCCGAAAGGCCUUCCGAAAGGACGUCCGUAAGGGAUACCC

SEQ ID NO 152 (Type1.5)
GGAGUACGCCGAAAGGCGCUUCCGAAAGGACGUCCGUAAGGGAUACUCC

SEQ ID NO 153 (Type 2.1)
GGAAUCAUACCGAGAGGUAUUACCCCGAAAGGGGACCAUUCC

SEQ ID NO 154 (D9.1)
GGAAUCAUACACAAGAGUGUAUUACCCCCAACCCAGGGGGACCAUUCC

SEQ ID NO 155 (C11.1)
GGAAGAAUGGUCGGAAUCUCUGGCGCCACGCUGAGUAUAGACGGAAGCUCCGCCAGA

SEQ ID NO 156 (C11.2)
GGAGGCGCCACGCUGAGUAUAGACGGAAGCUCCGCCUCC

SEQ ID NO 157 (C10.1)
GGACACAAGAGAUGGUAUUCAGGCGGUCCGCAUUGAUGUCAGUUAUGCGUAGCUCCGCC

SEQ ID NO 158 (C10.2)
GGCGGUCCGCAUUGAUGUCAGUUAUGCGUAGCUCCGCC

[00308] Tabla 21 - datos de unión de minímero PN-IL-23 rRfY

SEQ ID No.	Clone Description	+/-IL-23 20 nM	+/-IL-23 100 nM	IL-23 K_D (nM)
135	A10min1	2.2	3.1	
136	A10min2	4.4	6.0	
137	A10min3	0.8	1.6	
138	A10min4	0.9	0.7	
146	F11min1	0.8	0.6	
147	F11min2	7.8	16.9	65
141	B10min1	7.5	33.9	
142	B10min2	1.3	1.6	
143	B10min3	0.6	0.8	
139	A10min5	12.8	40.9	57.8
140	A10min6	13.6	41.7	48.3
144	B10min4	39.4	122.1	36.4
145	B10min5	20.7	89.2	276.9
148	IL-23 Type 1.1	1.4	0.9	
149	IL-23 Type 1.2	0.8	0.7	
150	IL-23 Type 1.3	0.8	0.6	
153	IL-23 Type 2.1	1.7	5.2	
154	D9.1	1.2	3.9	
155	C11.1	1.0	3.5	
156	C11.2	1.1	2.3	
157	C10.1	1.4	4.4	
158	C10.2	1.4	1.5	
151	IL-23 Type 1.4	2.3	11.7	185.3
152	IL-23 Type 1.5	5.2	26.9	31.4

**Ensayos desarrollados +0.1mg/mL tARN, 30 min incubación RT

**R&D IL-23 (proteína libre de portador)

Ejemplo 2A.2: Minimización de selección 1 dRmY:

[00309] Luego del proceso de selección de dRmY para unión de aptámeros a IL-23 (descrito en el ejemplo 1C anterior) y determinación de las secuencias de oligonucleótido, las secuencias se minimizan sistemáticamente para obtener secuencias de oligonucleótido más cortas que retienen las características de unión. Sobre la base de el análisis de unión IL-23 descrita en el ejemplo 1 A anterior y los datos de ensayo basados en célula descritos en el ejemplo 3 adelante el ARC 489 (SEQ ID NO 91) (74 mer) se escoge para caracterización adicional. Tres construcciones minimizadas basadas en clon ARC489 (SEQ ID NO 91) se diseñan y generan. Los clones se etiquetan en el extremo 5' con ATP y se ensayan en ensayos dot blot para determinación K-D utilizando el mismo método que para los clones parientes en 1X PBS +0.1 mg/mL tARN, 0.1 mg/mL de ADN de esperma de salmón 0.1 mg/mL DSA para una incubación de 30 minutos a temperatura ambiente. La tabla 22 muestras las secuencias de aptámeros de RMY minimizados. La tabla 23 incluye los datos de unión para los aptámeros de rRmY minimizados. Solo un clon minimizado, a ARC527 (SEQ ID NO 159), muestra la unión al IL-23. Este clon se prueba en el ensayo de activación STAT3 TransAM descrito en el ejemplo 3 adelante. Y muestra una reducción en la actividad del ensayo comparada con su pariente respectivo, ARC489 (ID de SEC ID NO 91).

[00310] Para los aptámeros de rmy minimizados descritos en la tabla 22 adelante, las purinas (A y G) son desoxipurinas y

las pirimidinas (U y C). A menos que se indique otra cosa, las secuencias individuales se representan en la orientación 5′ a 3′. Cada una de las secuencias listadas en la tabla 22 se pueden derivar con porciones de alquilenglicol ("PAG") y pueden o no contener taponadores). Por ejemplo un dt invertido 3′).

[00311] Tabla 22. Secuencias de dRmY minimizado

SEQ ID NO 159 (ARC527) ACAGCGCCGGUGGGCGGGCAUUGGGUGGAUGCGCUGU

SEQ ID NO 160 (ARC528) GCGCCGGUGGGCGGGCACCGGGUGGAUGCGCC

SEQ ID NO 161 (ARC529) ACAGCGCCGGUGUUUUCAUUGGGUGGAUGCGCUGU

[00312] Tabla 23: caracterización de unión de un minímero de selección dRmY

SEQ IDO	Nombre de clon	K_D (nM)
SEQ ID 159	ARC 527	12.6
SEQ ID 160	ARC 528	NB
SEQ ID 161	ARC 529	NB

**R&D IL-23 (proteína libre de portador)

N.B.= no se detecta unión

Ejemplo 2A.3 minimización de la selección 2 de dRmY

[00313] Luego del proceso de selección de dRmY para aptámeros que se unen al IL-23 (descrito en el ejemplo 1D

anterior) y determinación de las secuencias de oligonucleótido, las secuencias se minimizan sistemáticamente para obtener secuencias de oligonucleótido más cortas que retienen las características de unión.

[00314] Basado en el análisis de secuencias e inspección visual de las secuencias de aptámero de RmY pariente escritas en el ejemplo 1D, se presume que la conformación activa de los clones de unión de RmY hIL-23 y sus construcciones minimizadas se pliegan en una estructura G- cuarteto (figura 10). El análisis de las secuencias de unión funcionales revelan un patrón de G dobles consistentes con una formación de G cuarteto (tabla 24). Las secuencias dentro de la familia G cuarteto caen en dos subclases, aquellas con pares base 3 en el primer tallo y aquellas con 2. Se ha reportado que mucho de la misma forma en que se incrementa la fluorescencia del bromuro de etidio luego de unión al AR duplex y al ADN, que la fluorescencia N-metilmesoporfirin IX (NMM)se incrementa luego de la unión a las estructuras G-cuarteto (Arthanari et al, Nucleic Acids Research, 26(16): 3724 (1996); Marathais et al, Nucleic Acids Research, 28(9): 1969 (2000); Joyce et al, Applied Spectroscopy, 58(7): 831 (2004)). Así, como se muestra en la figura 11, se utiliza fluorescencia NMM para confirmar que el ARC 979 (SEQ ID NO 177) de hecho adopta una estructura g- cuarteto. De acuerdo con los protocolos de la literatura, reacciones de 100 litros que contienen ~1 micro molar NMM y ~ 2 micro molar de

aptámero en PDS de Dulbecco que contiene magnesio y calcio se analizan utilizando un lector de placa de fluorescencia Gemini XS Spectra max. El espectro de emisión de fluorescencia se recolecta de 550 a 750 NMM con excitación de longitud de honda de 405 nm. La estructura g- cuarteto del aptámero de ADN anti tombrina ARC183 Macaya et al, Proc. Natl. Acad. Sci., 90: 3745 (1993)) se utiliza como un control positivo en este experimento. El ARC1346 es un aptámero de una composición de nucleótido y tamaño similar como el arc979 (SEQ ID NO 177)que no se predice por tener una estructura G-cuarteto y se utiliza como un control negativo en el experimento. Como se puede ver en la figura 11, el ARC183 y el Arc 979 (SEQ ID NO 177) muestra un incremento significativo en fluorescencia NMM relacionada con NMM sola mientras que el control negativo, ARC 1346 no.

[00315] Se sintetizan construcciones minimizadas sobre un sintetizador de ADN ABIEXPEDITE luego se desprotrege por métodos estándar, los clones minimizados se purifican con gel sobre un gel PAG de 10%, y el ARN se eluye pasivamente en 300 mm de NaOAC y 20mM EDTA, seguido por precipitación de etanol.

[00316] Los clones se etiquetan en el extremo 5′ ATP -32 P y se ensayan en ensayos dot blot para determinación de K_D utilizando el ensayo de unión directo en el que el aptámero se radioetiqueta y mantienen en una concentración de traza (<90 pm) mientras que la concentración de IL-23 se varía, en

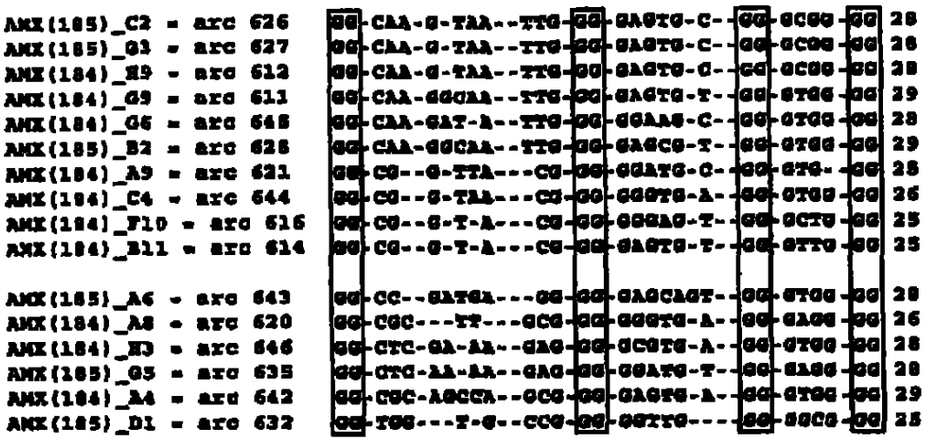
1X PBS con 0.1 mg/mL BSA, para incubación de 30 minutos a temperatura ambiente. La fracción de aptámero unida versus [IL-23] se utiliza para calcular el K_D al ajustar la siguiente ecuación a los datos:

Unión de fracción de aptámero= amplitud* ([aptámero]/(kd + [aptámero])) + unión de fondo.

[00318] Minímeros basados en cuarteto g son ligadores funcionales, mientras los minímeros basados en un algoritmo de pliegue que predice las argollas de tallo (estructura ARN; dH Mathews, et al., Expanded Sequence Dependence of Thermodynamic Parameters Improves Prediction of ARN Secondary Structure". Journal of Molecular Biology, 288, 911-940, (1999)) y que no contiene el patrón de dobles G que no son funcionales ARC97 SEQ ID NO 163)).

[00319] La tabla 25 adelante resume las secuencias minimizadas y el clon pariente del cual ellos se derivan, y la tabla 26 resume la caracterización de unión de ensayos de unión directos (+/- tARN) y los ensayos de unión de competición para la construcciones minimizadas ensayadas.

[00320] Tabla 24: Alineación de clones funcionales. (solo las regiones dentro del cuarteto se representan).



[00321] Las SEQ ID NOS para los clones listados en la Tabla 24 se encuentran en la Tabla 12.

[00322] Para los aptámeros dRmY minimizados descritos en Tabla 25 adelante, las purinas (A y G) son desoxipurinas y las pirimidinas (C y U) son pirimidinas 2'-OMe. A menos que se indique otra cosa, las secuencias individuales se representan en la orientación 5' a 3'. Cada una de las secuencias listadas en la Tabla 25 se pueden derivar con porciones de polialquilenglicol ("PAG") y pueden o no contener taponadores (por ejemplo, un dT invertido 3').

[00323] Tabla 25: Secuencias de minímero dRmY

SEQ ID NO	Clon Pariente	Minimero	Secuencia Minimizada
162	ARC627	ARC792	GGCAAGUAAUUGGGGAGUGCGGGCGGGG
163	ARC614	ARC793	CUACAAGGCGGUACGGGGAGUGUGG
164	ARC614	ARC794	GGCGGUACGGGGAGUGUGGGUUGGGGCCGG
165	ARC616	ARC795	CGAUAUAGGCGGUACGGGGGGAGUGGGCUGGGGUCG
166	ARC626	ARC796	UAAUUGGGGAGUGCGGGCGGGGGGUCGAUCG
167	ARC626	ARC797	GGUGGGGAGUGCGGGCGGGGGGUCGCC
168	ARC627	ARC889	ACAGGCAAGGUAAUUGGGGAGUGCGGGCGGGGGUGU
169	ARC627	ARC890	CCAGGCAAGGUAAUUGGGGAGUGCGGGCGGGGGUGG
170	ARC627	ARC891	GGCAAGGUAAUUGGGGAAGUGUGGGCGGGG
171	ARC627	ARC892	GGCAAGGUAAUUGGGGUAGUGAGGGCGGGG
172	ARC627	ARC893	GGCAAGGUAAUUGGGGAGUGCGGGCUGGG

173	ARC627	ARC894	GGCAAGGUAAUUGGGAAGUGUGGGCUGGG
174	ARC627	ARC895	GGCAAGGUAAUUGGGUAGUGAGGGCUGGG
175	ARC627	ARC896	ACAGGCAAGGUAAUUGGGUAGUGAGGGCUGGGUGU
176	ARC627	ARC897	GAUGUUGGCAAGUAAUUGGGGAGUGCGGGCGGGGUUCAUC-3T
177	ARC627	ARC979	ACAGGCAAGUAAUUGGGGAGUGCGGGCGGGGUGU
178	ARC627	ARC980	CCAGGCAAGUAAUUGGGGAGUGCGGGCGGGGUGG
179	ARC621	ARC981	GGCGGUUACGGGGGAUGCGGGUGGG
180	ARC621	ARC982	GGCGGUUACGGGGGAUGCGGGUGGGACAGG
181	ARC627	ARC1117	GGCAAGUAAUUGGGGAGUGCGGGCGG
182	ARC627	ARC1118	ACAGGCAAGUAAUUGGGGAGUGCGGGCGGUGU
183	ARC614	ARC1119	GGCGGUACGGGGAGUGUGGGUUGGGGCC
184	ARC614	ARC1120	GGCGGUACGGGGAGUGUGGGCUGGGGCC
185	ARC614	ARC1121	GGUACGGGGAGUGUGGGUUGGG
186	ARC614	ARC1122	GGUACGGGGAGUGUGGGCUGGG
187	ARC614	ARC1123	GGCGGUACGGGGAGUGUGGGUUGGGCC
188	ARC614	ARC1124	GGCGGUACGGGGAGUGUGGGCUGGGCC
189	ARC614	ARC1125	GGUACGGGGAGUGUGGGUUGG
190	ARC614	ARC1126	GGUACGGGGAGUGUGGGCUGG
191	ARC616	ARC1127	GGCGGUACGGGGGGAGUGGGCUGGGGUC
192	ARC616	ARC1128	GGCGGUACGGGGGGAGUGGGCUGGGUC
193	ARC616	ARC1129	GGCGGUACGGGGAGAGUGGGCUGGGGUC
194	ARC616	ARC1130	GGUACGGGGGGAGUGGGCUGGG
195	ARC616	ARC1131	GGUACGGGGGGAGUGGGCUGG
196	ARC616	ARC1132	GGUACGGGGAGAGUGGGCUGGG
197	ARC616	ARC1170	GGCGGUACGGGGGGAGUGGGCUGGG
198	ARC614	ARC1171	GGCGGUACGGGGAGUGUGGGUUGGG

[00324] Tabla 26: caracterización de unión de proteína de minímeros dRmY

SEQ ID NO	Minímero ARC#	K_D (+tRNA) nM	K_D (-tRNA) nM	K_D (competición) nM
162	ARC792	117		11

164	ARC794	69		14
165	ARC795	40		4
166	ARC796	106		
167	ARC797	50		
168	ARC889	115		
169	ARC890	114		
170	ARC891	177		
171	ARC892	255		
172	ARC893	2857		
173	ARC894	sin unión		
174	ARC895	sin unión		
175	ARC896	sin unión		
176	ARC897	93		
177	ARC979	93	90	9
178	ARC980	139		
179	ARC981	sin unión		
180	ARC982	sin unión		
181	ARC1117	<clon pariente		
182	ARC1118	<clon pariente		
183	ARC1119	<clon pariente		
184	ARC1120	<clon pariente		
185	ARC1121	<clon pariente		
186	ARC1122	<clon pariente		
187	ARC1123	<clon pariente		
188	ARC1124	<clon pariente		
189	ARC1125	<clon: pariente		
190	ARC1126	<clon		

		pariente		
191	ARC1127	<clon pariente		
192	ARC1128	<clon pariente		
193	ARC1129	<clon pariente		
194	ARC1130	<clon pariente		
195	ARC1131	<clon pariente		
196	ARC1132	<clon pariente		
197	ARC1170	Sin unión		
198	ARC1171	Sin unión		

[00325] Los datos de unión competitivos se re-analizan en un experimento de unión de saturación en donde la concentración del ligando (aptámero) se varía y la concentración del receptor (IL-23) se mantiene constante y el [aptámero unido] se grafica versus el [el aptámero total de entrada] ARC979 (SEQ ID 177) se utiliza en este ensayo.

[00326] El [ARC979] unido saturado en ~1.7 nM (figura 12), que sugiere que la concentración del IL-23 que es competente para unir el aptámero es 1 nM, o 2% (1/50/ de la entrada IL-23. El valor K_D es de 8 nM, que está bien de acuerdo con el

valor obtenido al ajustar los datos representado en el modo de competición (8.7 nM).

[00327] Cuando los datos de unión de competición IL-23 se someten al mismo análisis (figura 13), la fracción IL-12 activa fue mayor (10%), y la especificidad del ARC979 para IL-23 vs. IL-12 (33-pliegues) fue mayor que el que se predijo por la medición de unión directa (2-5 pliegues).

[00328] posteriormente, el ensayo de unión directo se repite para el ARC979 utilizando las condiciones de reacción de unión directas descritas previamente (1X PBS con 0.1 mg/mL BSA para incubación de 30 minutos a temperatura ambiente) y utilizar diferentes condiciones de reacción de unión (1X PBS Dulbecco (con Mg^{++} y Ca^{++}) con 0.1 mg/mL BSA durante 30 minutos a temperatura ambiente). En ambos, se purifican los aptámeros sintetizados química y nuevamente utilizando electrofóresis de gel de poliacrilamida desnaturalizado, etiquetado en el extremo 5' con ATP γ-^{32}P y se ensayan para unión directa al IL-23 humano completo. Se utiliza titilación de proteína de 8 puntos en el ensayo de unión dot blot ({100 nM, 30 nM, 10 nM, 3 nM, 1 nM, 300 pM, 100 pM, 0 pM} o {10 nM, 3 nM, 1 nM, 300 pM, 100 pM, 30 pM, 10 pM, 0 pM}). Se calculan los valores K_D al ajustar la ecuación y= (max/ (1+K/proteína)) +yint utilizando KaleidaGraph (KaleidaGraph v. 3.51, Synergy Software). Las condiciones de amortiguador parecen afectar en lago la afinidad de unión. Bajo la

condición 1X PBS, el valor K_D para el ARC979 se calcula que es ~10 nM, mientras que bajo la condición PBS de Dulbecco 1X, el valor K_D para el ARC979 se calcula que es de ~1 nM. (Ver figura 14). Estos valores K_D se verifican en ensayos posteriores (datos no mostrados), y son consistentes con el valor IC_{50} de ~ 6 nM que produce ARC979 en el ensayo PHA Blast descrito adelante en el ejemplo 3D.

Ejemplo 2A.4: minimización de IL-23 rRfY

[00329] basado en inspecciones visuales de las secuencias de clon parientes de los aptámeros IL-23 rRfY descritos en el ejemplo 1E, y las estructuras de ARN predichas utilizando un programa de pliegue ARN (estructura ARN), se diseñan construcciones minimizadas para cada uno de los 7 clones de unión mIL-23. Plantillas de PCR para los olivos de construcción minimizados se ordenan de tecnologías de ADN integradas (Coraville, IA). Las construcciones se amplifican con PCR, se transcribe, se purifica con gel, y se prueban para unir al mIL-23 utilizando en el ensayo de unión de dot blot previamente descrito. De combina la traza de ARN ^{32} P etiquetada con mIL-23 e incubada a temperatura ambiente durante 30 min en 1X PBS más 0.1 mg/mL BSA para un volumen final de 30 µL. La reacción se agrega a un aparato dot blot (Schleicher and Schuell Minifold-1 Dot Blot, Acrylic). Se generan curvas de unión como se describe en secciones anteriores. La tabla 32 lista las secuencias de

construcciones minimizadas de unión del mIL-23. La tabla 33 resume la caracterización de proteínas de unión para cada construcción minimizada rRfY que tiene unión significativa al mIL-23.

[00330] a menos que se indique otra cosa, las secuencias individuales listadas adelante se representa en la orientación 5′ a 3′ y representan las secuencias que unen al IL-23 de ratón seleccionado bajo condiciones rRfY SELEX™ en donde las purinas (A y G) son 2′-OH y las pirimidinas (U y C) son 2′-fluoro. Cada una de las secuencias listadas en la tabla 32 se puede derivar con porciones de polialquileno glicol ("PAG") y pueden o no contener taponadores (por ejemplo, un dT invertido 3′).

[00331] la tabla 32 minimiza las secuencias de clon rRfY de ratón

SEQ ID NO 199 (ARC 1739)
GGGCACUCAGCCACAGGUGGCUUAAUACUGUAAAGACGUGCCC
SEQ ID NO 200 (ARC 1918)
GGAGCGCACUCAGCCACCGGCUUAAUAUCCAAUAGGAACGUUCGCUCU
SEQ ID NO 201
GGGCACUCAGCCACAGCUCGGUGGCUUAAUAUCUAUGUGAACGUGCCC
SEQ ID NO 202
GGGCACUCAGCCACCUUGGGCUUAAUACCUAUCGGAUGUGCCC

[00332] tabla 33: resumen de clon K_D mIL-23 rRfY

Clon minimizado SEQ ID NO	Nombre de clon pariente	Clon pariente SEQ ID NO	K_D Mil-23 (nM)
199	ARC1628	124	1
200	ARC1632	128	1
201	ARC1633	129	25
202	ARC1634	130	19

* 30 min de incubación RT para determinación de K_D

* 1X PBS +0.1mg/mL de amortiguador de reacción BSA

EJEMPLO 2B: optimización a través de química medicinal

[00333] la química medicinal del aptámero es una técnica de mejoramiento en el que conjuntos de aptámeros variantes se sintetizan químicamente. Estos conjuntos de variantes difieren típicamente del aptámero pariente por la introducción de un sustituyente único, y difieren el uno del otro por la ubicación de este sustituyente. Estas variantes se comparan entonces la una con la otra y con el pariente. Las mejoras en las características pueden ser suficientemente profundas de tal forma que la inclusión de un sustituyente único puede ser todo lo necesario para alcanzar un criterio terapéutico particular.

[00334] Alternativamente la información recolectada del conjunto de variantes sencillas se puede utilizar parea diseñar conjuntos adicionales de variantes en el que más de un sustituyente se introduce simultáneamente. En una

estrategia de diseño, se clasifican todas las variantes de sustituyentes únicas, las 4 más latas ase escogen y todas las combinaciones posibles (6), triple (4) y cuádruple (1) de estos 4 variantes sustituyentes únicas se sintetizan y se ensayan. En una estrategia de diseño secundaria, se considera la mejor variante de sustituyente única para ser el nuevo pariente y todas las variantes de sustituyentes dobles posibles que incluyen esta variante de sustituyente clasificada más alta que se sintetiza y ensaya. Se pueden utilizar otras estrategias, y estas estrategias se pueden aplicar repetidamente de tal forma que el número de sustituyentes se incrementa gradualmente mientras se continúa para identificar variantes adicionales mejoradas.

[00335] la química medicinal de aptámero es más valioso como un método para exploración local a diferencia de la global, introducción de sustituyentes. En razón a que los aptámeros se descubren dentro de las librerías que se generan por transcripción, cualquier sustituyente que se introduce durante el proceso SELEX™ se debe introducir globalmente. Por ejemplo si se desea introducir enlaces de fosforotioato entre nucleótidos ellos solo se pueden introducir en cada A (o cada G, C, T, U etc.)(Sustituida globalmente). Los aptámeros que requieren fosforotioatos el alguno A (o algunos G, C, T, U etc.) (Sustituida globalmente) pero no pueden tolerarla en otros A no pueden ser fácilmente descubiertos por este proceso.

[00336] las clases de sustituyentes que se pueden utilizar por el proceso de química medicinal de aptámero solo se limitan por la capacidad de generarlas como reactivos síntesis de fase sólida e introducirlas en un esquema de síntesis de oligómero. El proceso ciertamente no se limita a solo nucleótidos. Los esquemas de química medicinal de aptámeros pueden incluir sustituyentes que introducen estéricos en masa, hidrofobicidad, hidrofilicidad, lipofilicidad, lopifobicidad, carga positiva, carga negativa, carga neutral, suiteriones, polarizabilidad, resistencia de la nucleasa, rigidez conformacional, flexibilidad conformacional, características de unión de proteína, masa, etc. Esquemas de química medicinal de aptámeros pueden incluir modificación base, modificaciones de azúcar, o modificación de fosfodiéster.

[00337] Cuando se considera las clases de sustituyentes que probablemente son benéficos dentro del contexto de un aptámero terapéutico, puede ser deseable introducir sustituciones que caen dentro de una o más de las siguientes categorías:

(1) Los sustituyentes ya presentes en el cuerpo, (por ejemplo 2'-desoxi, 2'-ribo, 2'O-metilo purinas o pirimidinas o 5-metilo citosina.

(2) Sustituyentes ya parte de un terapéutico aprobado, por ejemplo, oligonucleótidos ligados con fosforotioato

(3) Sustituyentes que hidrolizan o degradan a una de las dos anteriores categorías, por ejemplo, oligonucleótidos ligados con metil fosfonato.

Ejemplo 2B.1: optimización de ARC979 por sustitución de fosfosrotioato

[00338] El ARC979 (SEQ ID NO 177) es un aptámero de nucleótido 34 para el IL-23 de composición dRmY. 21 derivados de fosforotioato de ARC979 se diseñan y sintetizan en el que las sustituciones de fosforotioato sencillas se hacen en cada enlace de fosfato (ARC 1149 a ARC 1169) (SEQ ID NO 203 a SEQ ID NO 223) (ver Tabla 27). Estas moléculas se purifican con gel y se ensayan para unión de IL-23 utilizando el ensayo dot blot según se describió anteriormente y según se compara el uno con el otro y con la molécula pariente, ARC979. En la titilación IL-23 de 8 puntos (0 nM a 300 nM, diluciones seriales de 3 pliegues) se utiliza en el ensayo de unión. El K_Ds calculado se resume en la tabla 28.

[00339] la inclusión de enlaces de fosforotioato en ARC979 fue bien tolerado según se compara con el ARC979. Muchas de

estas construcciones tienen una porción incrementada de unión al IL-23 y adicionalmente tienen valor K_D mejorados (es decir inferiores) (figura 15). Un incremento similar en la afinidad se ve en ensayos de competición (figura 16), que soportan adicionalmente que los derivados de fosforotioato de ARC979 compitan para el IL-23 en una afinidad mayor que el ARC979.

[00340] a menos que se indique otra cosa, cada una de las secuencias listadas en la tabla 27 adelante están en la dirección 5'-3', se pueden derivar con porciones de polialquilenglicol ("PAG") y pueden o no contener taponadores (por ejemplo, un dT invertido 3')

[00341] Tabla 27: secuencias de derivados de fosforotioato ARC979: sustituciones de fosforotioato sencillas

SEQ ID NO	ARC#	Ligador de fosforotioato entre bases (x,y)	Secuencias

203	ARC1149	1	2	ACAGGCAAGUAAUUGGGGAGUGCGGGCGGGGUGU
204	ARC1150	2	3	ACAGGCAAGUAAUUGGGGAGUGCGGGCGGGGUGU
205	ARC1151	6	7	ACAGGCAAGUAAUUGGGGAGUGCGGGCGGGGUGU
206	ARC1152	7	8	ACAGGCAAGUAAUUGGGGAGUGCGGGCGGGGUGU
207	ARC1153	8	9	ACAGGCAAGUAAUUGGGGAGUGCGGGCGGGGUGU
208	ARC1154	9	10	ACAGGCAAGUAAUUGGGGAGUGCGGGCGGGGUGU
209	ARC1155	10	11	ACAGGCAAGUAAUUGGGGAGUGCGGGCGGGGUGU
210	ARC1156	11	12	ACAGGCAAGUAAUUGGGGAGUGCGGGCGGGGUGU
211	ARC1157	12	13	ACAGGCAAGUAAUUGGGGAGUGCGGGCGGGGUGU
212	ARC1158	13	14	ACAGGCAAGUAAUUGGGGAGUGCGGGCGGGGUGU
213	ARC1159	14	15	ACAGGCAAGUAAUUGGGGAGUGCGGGCGGGGUGU
214	ARC1160	15	19	ACAGGCAAGUAAUUGGGGAGUGCGGGCGGGGUGU
215	ARC1161	19	20	ACAGGCAAGUAAUUGGGGAGUGCGGGCGGGGUGU
216	ARC1162	20	21	ACAGGCAAGUAAUUGGGGAGUGCGGGCGGGGUGU
217	ARC1163	21	22	ACAGGCAAGUAAUUGGGGAGUGCGGGCGGGGUGU
218	ARC1164	22	23	ACAGGCAAGUAAUUGGGGAGUGCGGGCGGGGUGU
219	ARC1165	26	27	ACAGGCAAGUAAUUGGGGAGUGCGGGCGGGGUGU
220	ARC1166	27	28	ACAGGCAAGUAAUUGGGGAGUGCGGGCGGGGUGU
221	ARC1167	28	29	ACAGGCAAGUAAUUGGGGAGUGCGGGCGGGGUGU
222	ARC1168	28	33	ACAGGCAAGUAAUUGGGGAGUGCGGGCGGGGUGU
223	ARC1169	33	34	ACAGGCAAGUAAUUGGGGAGUGCGGGCGGGGUGU

[00342] Tabla 28: K_D para derivados de fosforotioato ARC979

SEQ ID NO	ARC#	K_D (+tARN) nM	K_D (+tARN) nM	K_D (competición) nM
177	ARC979	93	90	9
203	ARC1149	no		
204	ARC1150	no		
205	ARC1151		142	
206	ARC1152		232	
207	ARC1153		174	
208	ARC1154		412	
209	ARC1155		168	
210	ARC1156		369	
211	ARC1157		69	
212	ARC1158		192	

213	ARC1159		77	
214	ARC1160		38	5
215	ARC1161		55	6
216	ARC1162		47	6
217	ARC1163		49	8
218	ARC1164		79	
219	ARC1165		55	
220	ARC1166		132	
221	ARC1167		107	
222	ARC1168		82	
223	ARC1169		74	

Ejemplo 2B.2: optimización: sustituciones 2'-OMe, fosforotioato e inosina

[00343] se hacen modificaciones sistemáticas para el ARC979 (SEQ ID NO 177) para incrementar la estabilidad general y la resistencia del plasma nucleasa. La variante más estable y potente del ARC979 se identifica a través de una aproximación sintética sistemática que involucra 4 fases de síntesis de aptámero, purificación y ensayo para actividad de unión. La primera etapa del proceso es la síntesis y ensayo para actividad de unión del ARC1386 (SEQ ID NO 224) (ARC979 con un dT invertido 3'). Una ves se muestra el ARC1386 (SEQ ID NO 224) que se une al IL-23 con afinidad similar a aquella de la molécula pariente ARC979 (SEQ ID NO 177), todos los derivados posteriores del ARC979 se sintetizan con un dT invertido 3' estabilizante.

[00344] el ensayo de unión de dot blot previamente descrito se utiliza para caracterizar la potencia relativa de la mayoría de aptámeros sintetizados. Para la determinación K_D, los aptámeros químicamente sintetizados se purifican utilizando electroforesis de gel de poliacrilamida desnaturalizado, marcado en el extremo 5' con ATP γ-^{32}P y se ensaya para unión directa al IL-23 humano completo. Se utiliza titulación de proteína de 8 puntos en el ensayo de unión dot blot ({100 nM, 30 nM, 10 nM, 3 nM, 1 nM, 300 pM, 100 pM, 0 pM} o {10 nM, 3 nM, 1 nM, 300 pM, 100 pM, 30 pM, 10 pM, 0 pM}) en PBS Dulbecco (con Mg^{++} y Ca^{++}) con 0.1 mg/ mL BSA. Se calculan los valores K_D al ajustar la ecuación Y= (max/ (1+K/proteina)) +yint utilizando KaleidaGraph (KaleidaGraph v. 3.51, Synergy Software). Las secuencias de los derivados ARC979 sintetizados, purificados y ensayados para unir al IL-23 así como también los resultados de la caracterización de unión de proteína se tabulan adelante en las tablas 29 y 30. Como se puede ver en la tabla 30, y como se describe previamente en el ejemplo 2A.3 anterior, ARC1386 (SEQ ID NO 224) (que es ARC979 (SEQ ID NO 177) con un dT invertido 3') tiene un KD de 1 nM bajo esas condiciones.

[00345] En la fase 1 del proceso de optimización, comprendido ARC 1427-ARC 1471 (SEQ ID NOs 225-269), cada residuo de purina individual en ARC 1386 (SEQ ID NO 224) se reemplaza por el correspondiente 2'O-metilo que contiene residuo. Adicionalmente en la fase 1, una serie de

sustituciones de fosforotioato compuesto e individual se ensayan basadas en resultados generados previamente se han sugerido que en la adición para conferir estabilidad nucleasa y las sustituciones de fosforotioato mejoran la afinidad de unión de los derivados del ARC979. Finalmente al final de la fase 1, una serie de aptámeros se ensayan que exploran el rol adicional del tallo 1 en el contexto funcional de ARC 979/ARC 1386. Como se ve de los datos de unión en la tabla 30, mucha posiciones ya toleran la sustitución de un residuo desoxi para un residuo 2'-O metilo. En adición de cualquier fosforotioato particular no parece conferir una mejora significativa en la afinidad de los aptámeros. De forma interesante, como se puede ver por la comparación del ARC 1465-1471 (SEQ ID NOs 263-269), el tallo 1 es importante para el mantenimiento de la unión de alta afinidad, sin embargo su papel parece ser una grapa estructural en razón a la introducción de los espaciadores PEG entre en el núcleo del aptámero y las dos hebras que compuesto que comprenden el tallo 1 que no aparece impactar significativamente las propiedades de unión de los aptámeros.

[00346] Basado en los resultados (SAR) de relación de actividad de estructura de la fase 1 del proceso de optimización, se diseña una segunda serie de aptámeros, sintetizados, purificados y ensayados por unirse IL-23. En la fase de optimización 2 comprendía de ARC 1539-ARC 1545 (SEQ ID NOs 270-276), los datos de la fase 1 se utilizan para

529

generar más moléculas de compuesto altamente modificadas utilizando exclusivamente sustituciones 2'-0 metilo. Para estos y todas las moléculas posteriores, la meta fue identificar moléculas que retienen una afinidad (K_D) de ~ 2 nM o mejor así como también una alcance de unión en 100 nM (o 10 nM en las fases 3 y 4) IL-23 de al menos 50%. El mejor de estos en términos de afinidad de un simple fue el ARC 1544 (SEQ ID NO 275).

[00347] En la fase 3 de optimización comprendía el ARC 1591-ARC 1626 (SEQ ID NOs 277-312), la estabilidad de la estructura G-cuarteto del ARC 979 (SEQ ID NO 177) se prueba al ensayar para el reemplazo sistemático durante unión IL-23 de (desoxi guanosina) dG don desoxi inosina (dI). En razón a que la desoxi inosina le falta la amina exocíclica encontradas en la desoxi guanosina, una amina sencilla para unión con el hidrogeno N7 se remueve de un G-cuarteto potencial para cada sustitución dG a dI. Como se ve de los datos solo la sustitución significativa conduce a reducción sustancial en afinidad para el IL-23 lo que sugiere que la estructura del aptámero es robusta. Adicionalmente, la adición de fosforotioato que contiene residuos en el contexto ARC 1544 (SEQ ID NO 275) se evalúa (comprendiendo ARC 1620 a ARC 1626 (SEQ ID NOs 306-312). Como se puede ver en la tabla 30 las afinidades del ARC 1620-1626 (SEQ ID NOs 306-312) están de hecho mejoradas con relación a la ARC 979 (SEQ ID NO 177). La figura 17 describe las curvas de unión para los

530

derivados ARC979 selectos (ARC 1624 y ARC 1625) de la fase 3 de optimización, mostrando las afinidades de unión mejoradas en forma destacada conferidas por la inclusión de residuos que contienen fosforotioato selecto, comparado con la molécula pariente ARC979.

[00348] La fase 4 de optimización, comprendida de ARC 1755-1756 (SEQ ID NOs 313-314), involucra solo dos secuencias en un intento por introducir más desoxi a las sustituciones 2'-O metilo y retenerla la actividad. Como se puede ver con el ARC 1755 y 1756, esos experimentos son exitosos.

[00349] a menos de que se indique otra cosa, cada una de las secuencias listadas en la tabla 29 está en la dirección 5' a 3' y se puede derivar con porciones de polialquilenglicol ("PAG").

[00350] tabla 29: información de secuencia de optimización de ARC 979 fase 1-4

SEQ ID NO	ARC#	Descripción	Secuencia (5'->3'), (3T = inv dT), (T=dT), (s=fosforotioato), (mN = 2'-O Metilo que contiene residuo) (dI = desoxi inosina que contiene residuo
224	ARC1386	ARC 979 con 3'-inv dT	dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGdGdGdG dAdGmUdGmCdGdGdGmCdGdGdGdGmUdGmU-3T
225	ARC1427	ARC 979 opt fase 1	mAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGdGdGd GdAdGmUdGmCdGdGdGmCdGdGdGdGmUdGmU-3T
226	ARC1428	ARC 979 opt fase 1	dAmCmAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGdGdGd GdAdGmUdGmCdGdGdGmCdGdGdGdGmUdGmU-3T
227	ARC1429	ARC 979 opt fase 1	dAmCdAmGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGdGdGd GdAdGmUdGmCdGdGdGmCdGdGdGdGmUdGmU-3T
228	ARC1430	ARC 979 opt fase 1	dAmCdAdGmGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGdGdGd GdAdGmUdGmCdGdGdGmCdGdGdGdGmUdGmU-3T
229	ARC1431	ARC 979 opt fase 1	dAmCdAdGdGmCmAdAdGmUdAdAmUmUdGdGdGd GdAdGmUdGmCdGdGdGmCdGdGdGdGmUdGmU-3T
230	ARC1432	ARC 979 opt fase 1	dAmCdAdGdGmCdAmAdGmUdAdAmUmUdGdGdGd GdAdGmUdGmCdGdGdGmCdGdGdGdGmUdGmU-3T

231	ARC1433	ARC979 opt fase 1	dAmCdAdGdGmCdAdAmGmUdAdAmUmUdGdGdGd GdAdGmUdGmCdGdGdGmCdGdGdGdGmUdGmU-3T
232	ARC1434	ARC979 opt fase 1	dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUmAdAmUmUdGdGdGd GdAdGmUdGmCdGdGdGmCdGdGdGdGmUdGmU-3T
233	ARC1435	ARC979 opt fase 1	dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAmAmUmUdGdGdGd GdAdGmUdGmCdGdGdGmCdGdGdGdGmUdGmU-3T
234	ARC1436	ARC979 opt fase 1	dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUmGdGdGd GdAdGmUdGmCdGdGdGmCdGdGdGdGmUdGmU-3T
235	ARC1437	ARC979 opt fase 1	dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGmGdGd GdAdGmUdGmCdGdGdGmCdGdGdGdGmUdGmU-3T
236	ARC1438	ARC979 opt fase 1	dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGdGmGd GdAdGmUdGmCdGdGdGmCdGdGdGdGmUdGmU-3T
237	ARC1439	ARC979 opt fase 1	dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGdGdGm GdAdGmUdGmCdGdGdGmCdGdGdGdGmUdGmU-3T
238	ARC1440	ARC979 opt fase 1	dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGdGdGdG mAdGmUdGmCdGdGdGmCdGdGdGdGmUdGmU-3T
239	ARC1441	ARC979 opt fase 1	dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGdGdGdG dAmGmUdGmCdGdGdGmCdGdGdGdGmUdGmU-3T
240	ARC1442	ARC979 opt fase 1	dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGdGdGdG dAdGmUmGmCdGdGdGmCdGdGdGdGmUdGmU-3T
241	ARC1443	ARC979 opt fase 1	dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGdGdGdG dAdGmUdGmCmGdGdGmCdGdGdGdGmUdGmU-3T
242	ARC1444	ARC979 opt fase 1	dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGdGdGdG dAdGmUdGmCdGmGdGmCdGdGdGdGmUdGmU-3T
243	ARC1445	ARC979 opt fase 1	dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGdGdGdG dAdGmUdGmCdGdGmGmCdGdGdGdGmUdGmU-3T
244	ARC1446	ARC979 opt fase 1	dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGdGdGdG dAdGmUdGmCdGdGdGmCmGdGdGdGmUdGmU-3T
245	ARC1447	ARC979 opt fase 1	dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGdGdGdG dAdGmUdGmCdGdGdGmCdGmGdGdGmUdGmU-3T
246	ARC1448	ARC979 opt fase 1	dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGdGdGdG dAdGmUdGmCdGdGdGmCdGdGmGdGmUdGmU-3T
247	ARC1449	ARC979 opt fase 1	dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGdGdGdG dAdGmUdGmCdGdGdGmCdGdGdGmGmUdGmU-3T

248	ARC14 50	ARC979 opt fase 1	dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGdGdGdG dAdGmUdGmCdGdGdGmCdGdGdGdGmUmGmU-3T
249	ARC14 51	ARC979 opt fase 1	mAmCmAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGdGdGd GdAdGmUdGmCdGdGdGmCdGdGdGdGmUmGmU-3T
250	ARC14 52	ARC979 opt fase 1	dAmCdAdGdGmCmAmAdGmUdAdAmUmUmGdGdGd GdAdGmUdGmCdGdGdGmCdGdGdGdGmUdGmU-3T
251	ARC14 53	ARC979 opt fase 1	dAmCdA-s-dGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGdGdGdG dAdGmUdGmCdGdGdGmCdGdGdGdGmUdGmU-3T
252	ARC14 54	ARC979 opt fase 1	dAmCdAdG-s-dGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGdGdGdGdAdGmUdGmCdGdGdGmCdGdGdGdGmUdGmU-3T
253	ARC14 55	ARC979 opt fase 1	dAmCdAdGdG-s-mCdAdAdGmUdAdAmUmUdGdGdGdGdAdGmUdGmCdGdGdGmCdGdGdGdGmUdGmU-3T
254	ARC14 56	ARC979 opt fase 1	dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdG-s-dGdGdGdAdGmUdGmCdGdGdGmCdGdGdGdGmUdGmU-3T
255	ARC14 57	ARC979 opt fase 1	dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGdG-s-dGdGdAdGmUdGmCdGdGdGmCdGdGdGdGmUdGmU-3T
256	ARC14 58	ARC979 opt fase 1	dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGdGdG-s-dGdAdGmUdGmCdGdGdGmCdGdGdGdGmUdGmU-3T
257	ARC14 59	ARC979 opt fase 1	dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGdGdGdG dAdGmUdGmC-s-dGdGdGmCdGdGdGdGmUdGmU-3T
258	ARC14 60	ARC979 opt fase 1	dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGdGdGdG dAdGmUdGmCdG-s-dGdGmCdGdGdGdGmUdGmU-3T
259	ARC14 61	ARC979 opt fase 1	dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGdGdGdG dAdGmUdGmCdGdG-s-dGmCdGdGdGdGmUdGmU-3T
260	ARC14 62	ARC979 opt fase 1	dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGdGdGdG dAdGmUdGmCdGdGdGmCdGdG-s-dGdGmUdGmU-3T
261	ARC14 63	ARC979 opt fase 1	dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGdGdGdG dAdGmUdGmCdGdGdGmCdGdGdG-s-dGmUdGmU-3T
262	ARC14 64	ARC979 opt fase 1	dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGdGdGdG dAdGmUdGmCdGdGdGmCdGdGdGdG-s-mUdGmU-3T
263	ARC14 65	ARC979 opt fase 1	dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdA-s-dAmUmUdGdGdGdGdA-s-dG-s-mU-s-dG-s-

534

			mCdGdGdG-s-mCdGdGdGdGmUdGmU-3T
264	ARC1466	ARC979 opt fase 1	dAmCdAPEGdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGdGdGdGdAdGmUdGmCdGdGdGmCdGdGdGdGPEGmUdGmU-3T
265	ARC1467	ARC979 opt fase 1	mCmGmCdAPEGdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGdGdGdGdAdGmUdGmCdGdGdGmCdGdGdGdGPEGmUdGmCmG-3T
266	ARC1468	ARC979 opt fase 1	dGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGdGdGdGdAdGmUdGmCdGdGdGmCdGdGdGdG-3T
267	ARC1469	ARC979 opt fase 1	dGdGmCmAmAdGmUdAdAmUmUmGdGdGdGdAdGmUdGmCdGdGdGmCdGdGdGdG-3T
268	ARC1470	ARC979 opt fase 1	dGdGmCdAdAdGmUdA-s-dAmUmUdGdGdGdGdA-s-dG-s-mU-s-dG-s-mCdGdGdG-s-mCdGdGdGdG-3T
269	ARC1471	ARC979 opt fase 1	dGdGmCmAmAdGmUdA-s-dAmUmUmGdGdGdGdA-s-dG-s-mU-s-dG-s-mCdGdGdG-s-mCdGdGdGdG-3T
270	ARC1539	ARC979 opt fase 2	mAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGdGdGdGdAdGmUdGmCdGdGdGmCdGdGdGdGmUmGmU-3T
271	ARC1540	ARC979 opt fase 2	dAmCdAdGdGmCdAmAmGmUmAdAmUmUdGdGdGdGdAdGmUdGmCdGdGdGmCdGdGdGdGmUdGmU-3T
272	ARC1541	ARC979 opt fase 2	dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGdGdGmGmAmGmUmGmCdGdGdGmCdGdGdGdGmUdGmU-3T
273	ARC1542	ARC979 opt fase 2	dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGdGdGdGdAdGmUdGmCdGdGmGmCmGmGdGdGmUdGmU-3T
274	ARC1543	ARC979 opt fase 2	mAmCdAdGdGmCdAmAmGmUmAdAmUmUdGdGdGmGmAmGmUmGmCdGdGmGmCmGmGdGdGmUmGmU-3T
275	ARC1544	ARC979 opt fase 2	dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGmGmGdGdAdGmUdGmCmGmGdGmCdGdGmGmGmUdGmU-3T
276	ARC1545	ARC979 opt fase 2	mAmCdAdGdGmCdAmAmGmUmAdAmUmUdGmGmGmGmAmGmUmGmCmGmGmGmCmGmGmGmGmGmUmGmU-3T
277	ARC1591	ARC979 opt fase 3	dAmCdAdIdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGdGdGdGdAdGmUdGmCdGdGdGmCdGdGdGdGmUdGmU-3T
278	ARC1592	ARC979 opt fase 3	dAmCdAdGdImCdAdAdGmUdAdAmUmUdGdGdGdGdAdGmUdGmCdGdGdGmCdGdGdGdGmUdGmU-3T

279	ARC1593	ARC979 opt fase 3	dAmCdAdIdImCdAdAdGmUdAdAmUmUdGdGdGdGd AdGmUdGmCdGdGdGmCdGdGdGdGmUdGmU-3T
280	ARC1594	ARC979 opt fase 3	dAmCdAdGdGmCdAdAdImUdAdAmUmUdGdGdGdGd AdGmUdGmCdGdGdGmCdGdGdGdGmUdGmU-3T
281	ARC1595	ARC979 opt fase 3	dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdIdGdGdGd AdGmUdGmCdGdGdGmCdGdGdGdGmUdGmU-3T
282	ARC1596	ARC979 opt fase 3	dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGdIdGdGd AdGmUdGmCdGdGdGmCdGdGdGdGmUdGmU-3T
283	ARC1597	ARC979 opt fase 3	dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGdGdIdGd AdGmUdGmCdGdGdGmCdGdGdGdGmUdGmU-3T
284	ARC1598	ARC979 opt fase 3	dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGdGdGdId AdGmUdGmCdGdGdGmCdGdGdGdGmUdGmU-3T
285	ARC1599	ARC979 opt fase 3	dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdIdIdGdGd AdGmUdGmCdGdGdGmCdGdGdGdGmUdGmU-3T
286	ARC1600	ARC979 opt fase 3	dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGdIdIdGd AdGmUdGmCdGdGdGmCdGdGdGdGmUdGmU-3T
287	ARC1601	ARC979 opt fase 3	dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGdGdIdId AdGmUdGmCdGdGdGmCdGdGdGdGmUdGmU-3T
288	ARC1602	ARC979 opt fase 3	dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdIdIdIdIdAd GmUdGmCdGdGdGmCdGdGdGdGmUdGmU-3T
289	ARC1603	ARC979 opt fase 3	dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGdGdGdG dAdImUdGmCdGdGdGmCdGdGdGdGmUdGmU-3T
290	ARC1604	ARC979 opt fase 3	dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGdGdGdG dAdGmUdImCdGdGdGmCdGdGdGdGmUdGmU-3T
291	ARC1605	ARC979 opt fase 3	dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGdGdGdG dAdGmUdGmCdIdGdGmCdGdGdGdGmUdGmU-3T
292	ARC1606	ARC979 opt fase 3	dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGdGdGdG dAdGmUdGmCdGdIdGmCdGdGdGdGmUdGmU-3T
293	ARC1607	ARC979 opt fase 3	dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGdGdGdG dAdGmUdGmCdGdGdImCdGdGdGdGmUdGmU-3T
294	ARC1608	ARC979 opt fase 3	dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGdGdGdG dAdGmUdGmCdIdIdGmCdGdGdGdGmUdGmU-3T
295	ARC1609	ARC979 opt fase 3	dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGdGdGdG dAdGmUdGmCdGdIdImCdGdGdGdGmUdGmU-3T

296	ARC1610	ARC979 opt fase 3	dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGdGdGdG dAdGmUdGmCdIdIdImCdGdGdGdGmUdGmU-3T
297	ARC1611	ARC979 opt fase 3	dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGdGdGdG dAdGmUdGmCdGdGdGmCdIdGdGdGmUdGmU-3T
298	ARC1612	ARC979 opt fase 3	dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGdGdGdG dAdGmUdGmCdGdGdGmCdGdIdGdGmUdGmU-3T
299	ARC1613	ARC979 opt fase 3	dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGdGdGdG dAdGmUdGmCdGdGdGmCdGdGdIdGmUdGmU-3T
300	ARC1614	ARC979 opt fase 3	dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGdGdGdG dAdGmUdGmCdGdGdGmCdGdGdGdImUdGmU-3T
301	ARC1615	ARC979 opt fase 3	dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGdGdGdG dAdGmUdGmCdGdGdGmCdIdIdGdGmUdGmU-3T
302	ARC1616	ARC979 opt fase 3	dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGdGdGdG dAdGmUdGmCdGdGdGmCdGdIdIdGmUdGmU-3T
303	ARC1617	ARC979 opt fase 3	dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGdGdGdG dAdGmUdGmCdGdGdGmCdGdGdIdImUdGmU-3T
304	ARC1618	ARC979 opt fase 3	dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGdGdGdG dAdGmUdGmCdGdGdGmCdIdIdIdImUdGmU-3T
305	ARC1619	ARC979 opt fase 3	dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGdGdGdG dAdGmUdGmCdGdGdGmCdGdGdGdGmUdImU-3T
306	ARC1620	ARC979 opt fase 3	dAmC-s-dAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGmGmGdGdAd GmUdGmCmGmGdGmCdGdGmGmGmUdGmU-3T
307	ARC1621	ARC979 opt fase 3	dAmCdA-s-dG-s-dGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGmGmGdGdAdGmUd GmCmGmGdGmCdGdGmGmGmUdGmU-3T
308	ARC1622	ARC979 opt fase 3	dAmCdAdGdGmC-s-dA-s-dA-s-dGmU-s-dA-s-dAmUmU-s-dGmGmGdGdAdGmUdGmCmGmGdGmCdGdGmGmGmUdGmU-3T
309	ARC1623	ARC979 opt fase 3	dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGmGmG-s-dG-s-dA-s-dGmU-s-dGmCmGmGdGmCdGdGmGmGmUdGmU-3T
310	ARC1624	ARC979 opt fase 3	dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGmGmGdGdAdGmUdGmCmGmG-s-dGmC-s-dG-s-dGmGmGmUdGmU-3T
311	ARC1625	ARC979 opt fase 3	dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGmGmGdGdAdGmUdGmCmGmGdGmCdGdGmGmGmU-s-

			dGmU-3T
312	ARC1626	ARC979 opt fase 3	dAmC-s-dA-s-dG-s-dGmC-s-dA-s-dA-s-dGmU-s-dA-s-dAmUmU-s-dGmGmG-s-dG-s-dA-s-dGmU-s-dGmCmGmG-s-dGmC-s-dG-s-dGmGmGmU-s-dGmU-3T
313	ARC1755	ARC979 opt fase 4	mAmC-s-dAdGdGmC-s-dAmAmGmUmA-s-dAmUmU-s-dGmGmGmGmAmGmUmGmCmGmGmGmCmGmGmGmGmUmGmU-3T
314	ARC1756	ARC979 opt fase 4	mAmC-s-dAdGdGmC-s-dAmAmGmUmA-s-dAmUmU-s-dGmGmG-s-dG-s-dA-s-dGmU-s-dGmCmGmGmGmCmGmGmGmGmUmGmU-3T

[00351] Tabla 30: Caracterización de unión

SEQ ID NO	ARC #	Descripción	K_D (nM)	% de unión en 100 nM (a través de ARC1019) o ren 10 nM (ARC1620)-1756)
224	ARC1386	ARC 979 con dT inv 3-	1	69.9
225	ARC1427	ARC979 opt	3.0	49.4
226	ARC1428	ARC979 opt fase 1	1.8	57.8
227	ARC1429	ARC979 opt fase 1	29.5	48.4
228	ARC1430	ARC979 opt fase 1	14.2	51.6
229	ARC1431	ARC979 opt fase 1	10.0	56.3
230	ARC1432	ARC979 opt fase 1	3.8	57.9
231	ARC1433	ARC979 opt fase 1	2.8	55.2

232	ARC1434	ARC979 opt fase 1	3.0	52.9
233	ARC1435	ARC979 opt fase 1	9.8	51.2
234	ARC1436	ARC979 opt fase 1	15.1	46.9
235	ARC1437	ARC979 opt fase 1	3.9	43.1
236	ARC1438	ARC979 opt fase 1	6.0	36.7
237	ARC1439	ARC979 opt fase 1	4.8	43.5
238	ARC1440	ARC979 opt fase 1	6.7	54.9
239	ARC1441	ARC979 opt fase 1	2.7	49.8
240	ARC1442	ARC979 opt fase 1	2.8	60.5
241	ARC1443	ARC979 opt fase 1	2.0	52.8
242	ARC1444	ARC979 opt fase 1	4.4	58.1
243	ARC1445	ARC979 opt fase 1	2.8	56.3
244	ARC1446	ARC979 opt fase 1	2.1	55.0
245	ARC1447	ARC979 opt fase 1	2.5	56.5
246	ARC1448	ARC979 opt fase 1	2.3	59.5
247	ARC1449	ARC979 opt fase 1	2.6	48.4
248	ARC1450	ARC979 opt fase 1	2.6	46.5
249	ARC1451	ARC979 opt fase 1	10.2	46.1
250	ARC1452	ARC979 opt fase 1	18.9	56.9
251	ARC1453	ARC979 opt	4.4	65.0

		fase 1		
252	ARC1454	ARC979 opt fase 1	2.7	61.6
253	ARC1455	ARC979 opt fase 1	1.6	56.6
254	ARC1456	ARC979 opt fase 1	3.2	55.5
255	ARC1457	ARC979 opt fase 1	3.0	56.1
256	ARC1458	ARC979 opt fase 1	2.9	49.6
257	ARC1459	ARC979 opt fase 1	4.0	50.7
258	ARC1460	ARC979 opt fase 1	5.8	46.1
259	ARC1461	ARC979 opt fase 1	3.7	47.3
260	ARC1462	ARC979 opt fase 1	1.7	53.4
261	ARC1463	ARC979 opt fase 1	3.6	53.5
262	ARC1464	ARC979 opt fase 1	2.4	54.6
263	ARC1465	ARC979 opt fase 1	1.3	57.0
264	ARC1466	ARC979 opt fase 1	1.9	38.7
265	ARC1467	ARC979 opt fase 1	1.7	57.0
266	ARC1468	ARC979 opt fase 1	10.0	49.8
267	ARC1469	ARC979 opt fase 1	49.8	59.8
268	ARC1470	ARC979 opt fase 1	8.6	61.0
269	ARC1471	ARC979 opt fase 1	23.5	62.9
270	ARC1539	ARC979 opt fase 1	6.6	43.8

540

271	ARC1540	ARC979 opt fase 2	7.5	50.3
272	ARC1541	ARC979 opt fase 2	3.9	57.0
273	ARC1542	ARC979 opt fase 2	1.2	57.6
274	ARC1543	ARC979 opt fase 2	5.9	40.9
275	ARC1544	ARC979 opt fase 2	0.9	58.6
276	ARC1545	ARC979 opt fase 2	0.4 & 62.0	17.4 & 20.9
277	ARC1591	ARC979 opt fase 2		54.8
278	ARC1592	ARC979 opt fase 2	8.1	54.4
279	ARC1593	ARC979 opt fase 2	13.8	51.0
280	ARC1594	ARC979 opt fase 2	4.2	60.1
281	ARC1595	ARC979 opt fase 2	5.4	53.9
282	ARC1596	ARC979 opt fase 2	11.1	59.0
283	ARC1597	ARC979 opt fase 2	11.2	61.3
284	ARC1598	ARC979 opt fase 2	4.7	61.0
285	ARC1599	ARC979 opt fase 2	7.2	57.7
286	ARC1600	ARC979 opt fase 2	15.6	61.3
287	ARC1601	ARC979 opt fase 2	4.4	58.6
288	ARC1602	ARC979 opt fase 2	40.8	64.4

289	ARC1603	ARC979 opt fase 3	1.6	64.2
290	ARC1604	ARC979 opt fase 3	2.1	50.2
291	ARC1605	ARC979 opt fase 3	7.5	56.8
292	ARC1606	ARC979 opt fase 3	5.0	60.3
293	ARC1607	ARC979 opt fase 3	3.3	61.5
294	ARC1608	ARC979 opt fase 3	9.7	61.1
295	ARC1609	ARC979 opt fase 3	4.7	60.5
296	ARC1610	ARC979 opt fase 3	5.2	60.4
297	ARC1611	ARC979 opt fase 3	1.7	62.1
298	ARC1612	ARC979 opt fase 3	1.9	60.9
299	ARC1613	ARC979 opt fase 3	2.3	58.4
300	ARC1614	ARC979 opt fase 3	1.7	60.5
301	ARC1615	ARC979 opt fase 3	5.8	55.2
302	ARC1616	ARC979 opt fase 3	6.1	59.5
303	ARC1617	ARC979 opt fase 3	4.1	61.9
304	ARC1618	ARC979 opt fase 3	34.0	67.0
305	ARC1619	ARC979 opt fase 3	2.8	52.1
306	ARC1620	ARC979 opt fase 3	0.4	68.0
307	ARC1621	ARC979 opt fase 3	0.5	64.6
308	ARC1622	ARC979 opt	0.3	66.0

		Fase 3		
309	ARC1623	ARC979 opt: fase 3	0.2	68.7
310	ARC1624	ARC979 opt: fase 3	0.4	68.0
311	ARC1625	ARC979 opt: fase 3	0.4	75.0
312	ARC1626	ARC979 opt: fase 3	0.1	79.2
313	ARC1755	ARC979 opt: fase 4	0.8	31
314	ARC1756	ARC979 opt: fase 4	0.5	56

* 30 min de incubación RT para determinación K_D

* 1X PBS Dulbecco (con Ca^{++} y Mg^{++}) +0.1mg/mL de amortiguador de reacción BSA

Ejemplo 2C: estabilidad de plasma de aptameros anti-IL-23

[0352] un subconjunto de aptameros identificados durante proceso de optimización se ensaya para estabilidad de nucleasa en plasma humano. Se mide la degradación de nucleasa en plasma utilizando desnaturalización por electroforesis de gel de poliacrilamida como se describe adelante. En resumen, para la determinación de estabilidad de plasma, se purifican aptameros sintetizados químicamente utilizando desnaturalización por electroforesis de gel de poliacrilamida, marcada en el extremo 5' con ATP γ-32P y luego purificada por gel nuevamente. La traza de aptamero marcada 32P se incuba en la presencia de 100 nM de aptamero

no etiquetado en 95% de plasma humano en una reacción de unión de 200 microlitros. La reacción para el puntote tiempo 0 se hace separadamente con los mismos componentes excepto que el plasma se reemplaza con PBS para asegurar que la cantidad de radioactividad cargada en los geles es consistente a través del experimento. Las reacciones se incuban a 37°C en un termo ciclisador para las horas 1, 3, 10, 30 y 100. En cada punto de tiempo, 200 microlitros de la reacción se remueven, se combinan con 200 microlitros de tinte que carga formamida y chorro congelado en nitrógeno líquido y almacenado en -20°C. Después de que se toma el último punto de tiempo, las muestras congeladas se descongelan y 20 microlitros se remueven de cada punto de tiempo. Se agregan entonces SDS a muestras pequeñas para una concentración final de 0.1%. Las muestras se incuban luego a 90°C durante 10-15 minutos y se cargan directamente en un gel PAGE de desnaturalización 15% y corre en 12 w durante 35 minutos. La radioactividad en los geles se cuantifica utilizando un sistema Storm 860 fosforimager (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). El porcentaje de apatmeros de longitud completa en cada punto de tiempo se determina al cuantificar la longitud completa de la banda de aptameros y dividir por los conteos totales en la misma línea. La fracción de aptamero de longitud completa en cada punto de tiempo se normaliza luego al porcentaje de aptamero de longitud completa del punto de tiempote 0 horas. La fracción

de aptamero de longitud completa como una función del tiempo se ajusta a la ecuación:

M1*e^(-m2*m0)

Donde m1 es el porcentaje máximo de aptamero de longitud completa (m1=100); y m2 es el índice de degradación.

La vida media del aptamero ($T_{1/2}$) es igual al (ln 2)/m2.

[00353] Los datos de la muestra se exhibe en la figura 18 y los resultados para los aptameros ensayados se resumen en la tabla 31.

[00354] tabla 31: estabilidad de plasma

SEQ ID NO	ARC#	DESCRIPCIÓN	~T1/2 en plasma humano (hrs)
177	ARC979		14
224	ARC1386	ARC1386 con Dt inv 3'	33
307	ARC1621	ARC979 opt fase 3	59
308	ARC1622	ARC979 opt fase 3	54
309	ARC1623	ARC979 opt fase 3	45
310	ARC1624	ARC979 opt fase 3	35
311	ARC1625	ARC979 opt fase 3	31

312	ARC1626	ARC979 opt fase 3	113
313	ARC1755	ARC979 opt fase 4	83
314	ARC1756	ARC979 opt fase 4	96

EJEMPLO 3: ENSAYOS DE CÉLULAS FUNCIONALES

Ensayos basados en células minimización de aptameros rRfY IL-23 activos

[00355] El IL-23 juega un papel en la transducción de señal JAK/STAT y los fosforilatos STAT 1, 3, 4, y 5. para ensayar si los aptameros IL-23 muestran actividad basadas en células, se ensaya la transducción de señal en los lisatos de células mononucleares sanguíneas periféricas (PBMC) que crecen en medio que contiene PHA (fitohemaglutinina), o Blastos PHA. Más específicamente, el ensayo basado en células determina si los aptameros IL-23 pueden inhibir la fosforilación STAT-3 inducida por IL-23 en Blastos PHA.

[00356] En esencia, los lisatos de células IL-23 tratados contendrán más STAT3 activado que las células bloqueados de aptameros o quiescentes. La inhibición de la fosforilación STAT3 inducida por IL-23 se mide por dos métodos: por western blot, utilizando un anticuerpo anti-fosfo-STAT3 (Tyr705) (Cell Signaling, Beverly, MA); y por ensayo TransAM™ (Active Motif, Carlsbad, CA). El kit de ensayo TransAM™ suministra

una placa de 96 posos sobre la que un oligonucleótido que contiene el sitio de unión consenso STAT (5'TTCCCGGAA-3') se inmoviliza. Un anticuerpo anti-STAT3 que reconoce un epitopo en el STAT3 que solo es accesible cuando el STAT3 se activa se utiliza en conjunto con un anticuerpo secundario conjugado HRP para dar una lectura cororimetrica que se puede cuantificar por espectrofotometria. (Ver figura 19).

[00357] en resumen, el ensayo basado en células se conduce al aislar las células mononucleares sanguíneas periféricas (PBMC) de la sangre total utilizando un gradiente de Histopaque (Sigma, San Louis, MO). El PBMC se cultiva durante 3 a 5 días a 37°C/5% CO_2 en periferia Blood Medium (Sigma) que contiene PHA, complementado con IL-2 (100 unidades/mL) (R&D Systems, Minneapolis, MN), para generar Blastos PHA. Para ensayar aptameros IL-23, se lavan blastos PHA dos veces con 1X PBS, luego el suero se carga durante 4 horas en RPMI, 0.20 % FBS. Después de carga el suero aproximadamente dos millones de células se dividen en alicotas en tubos eppendorf marcados apropiadamente. El hIL-23 en una concentración constante final de 3 ng/mL (R&D Systems, Minneapolis, MN) se combina con series de dilución de varios aptameros IL-23 como se describe en el ejemplo 1, y la mezcla de citoquina/aptamero se agrega a las células divididas en alicotas en un volumen final de 100 µl y se incuban a 37°C durante 10-12 minutos. La reacción de incubación se detiene al agregar 1 mL de PBS enfriado con hielo con 1.5 mM de

Na_3VO_4.los lisatos de las células se hacen utilizando un amortiguador de lisis suministrado por el ensayo STAT 3 TransAM™ siguiendo las instrucciones del fabricante. La figura 20 describe un resumen del flujo del protocolo utilizado para el ensayo basado en células.

[00358] El aptamero pariente y los aptameros IL-23 minimizados de varias selecciones con grupos que contienen pirimidinas 2'-F (rRfY), grupos que contienen ribo/2'O-Me (rRmY), grupos que contienen desoxy/2'O-Me (dRmY), y aptameros dRmY optimizados se ensayan utilizando el método TransAM™.

Ejemplo 2A: resultados de ensayo basados en células para clones minimizados y parientes de selecciones rRfY

[00359] clones de longitud completa de selección rRfY descritos en el ejemplo 1A y clones rRfY minimizados selectos se describen en ejemplo 2A.1, se prueban utilizando el ensayo de activación STAT3 TransAM™. La tabla 34 resume los datos de ensayo basados en células para aptameros de longitud completa IL-23 generados de las selecciones rRfY descritas en el ejemplo 1A. La tabla 35 resume los datos de actividad de los clones rRfY minimizados, descritos en el ejemplo 2A.1, cada uno comparado con la actividad de su clon pariente respectivo (longitud completa). Los clones rRfY minimizados F11 min 2 (SEQ ID NO 147), A10 min 5 (SEQ ID NO 139), A10 min 6 (SEQ ID

NO 140), B10 min 4 (SEQ ID NO 144), B10 min 5 (SEQ ID NO 145), Tipo 1.4 (SEQ ID NO 151) y Tipo 1.5 (SEQ ID NO 152) cada uno ejecuta sus clones parientes respectivos (ver figura 21), en adición a todos los clones rRfY de longitud completa cuando se prueban en el ensayo de activación STAT3 TransAM™.

[00360] tabla 34: resultados de ensayos basados en células: resumen de clones rRfY ensayados

SEQ ID NO	Nombre de clon	Selección	Western Blot	TransAM	TransAM IC_{50}
27	AMX86-C5	R8 h-IL-23	Si	Si	3 µM
13	AMX86-D5	R8 h-IL-23	Si	Si	> 5 µM
16	AMX86-D6	R8 h-IL-23	Si	Si	> 5 µM
24	AMX86-E6	R8 h-IL-23	Si	No	
22	AMX86-F6	R8 h-IL-23	Si	No	
18	AMX86-A7	R8 h-IL-23	Si	No	
25	AMX86-H7	R8 h-IL-23	Si	No	
35	AMX86-B9	R8 X-IL-23	Si	No	
32	AMX86-C9	R8 X-IL-23	Si	No	
33	AMX86-G9	R8 X-IL-23	Si	No	
39	AMX86-H9	R8 X-IL-23	Si	Si	250 nM
28	AMX86-B10	R8 X-IL-23	Si	Si	800 nM

36	AMX86-G10	R8 X-IL-23	Si	Si	~2μM
37	AMX86-A11	R8 X-IL-23	Si	No	
30	AMX86-D11	R8 X-IL-23	Si	No	
43	AMX84-A10	R10 PN-IL-23	Si	Si	400 nM
44	AMX84-B10	R10 PN-IL-23	Si	Si	>1μM
45	AMX84-A11	R10 PN-IL-23	Si	Si	>5μM
46	AMX84-F11	R10 PN-IL-23	Si	Si	250 nM
47	AMX84-E12	R10 PN-IL-23	Si	Si	>1μM
48	AMX84-C10	R10 PN-IL-23	No	Si	250 nM
49	AMX84-C11	R10 PN-IL-23	No	Si	800 nM
50	AMX84-G11	R10 PN-IL-23	No	Si	250 nM
51	ARX83-platel-	R12 PN-IL23	No	Si	>5μM

	H1				
52	AMX91-F11	R10 PN-IL-23	No	Si	5µM
53	AMX91-G1	R10 PN-IL-23	No	Si	2µM
54	AMX91-E3	R10 PN-IL-23	No	Si	> 5µM
55	AMX91-H3	R10 PN-IL-23	No	Si	50nM
64	AMX91-G11	R12 PN-IL23	No	Si	3µM
65	AMX91-C12	R12 PN-IL23	No	Si	50nM
66	AMX91-H12	R12 PN-IL23	No	Si	350 nM
56	AMX91-B5	R10 PN-IL-23	No	Si	1µM
57	AMX91-A6	RI0 PN-IL-23	No	Si	3µM
58	AMX91-G7	R12 PN-IL23	No	Si	150nM
59	AMX91-H7	R12 PN-IL23	No	Si	50nM
60	AMX91-B8	R12 PN-IL23	No	Si	450 nM
61	AMX91-H8	R12 PN-IL23	No	Si	3µM
62	AMX91-G9	R12 PN-IL23	No	Si	50nM
63	AMX91-D9	R12 PN-IL23	No	Si	150 nM

[00361] Tabla 35: Comparación de unión de aptámero minimizado IL-23 2'F rRfY a aptámeros pariente.

SEQ ID NO	Nombre del clon	Selección			Mínimo IC_{50}	Longitud Total IC_{50}
		R10 PN-IL-	W.Blot	TransAM		
147	F11min2	23	No	Si	25nM	250 Nm
139	A10min5	R10PNIL-23	No	Si	300 nM	1 µM
140	A10min6	R10PNIL-23	No	Si	250 nM	1 µM
144	B10min4	R10PNIL-23	No	Si	500 nM	700 nM
145	B10min5	R10PNIL-23	No	Si	80 nM	700 nM
151	Tipo1.4	N/A	No	Si	80 nM	N/A
152	Tipo1.5	N/A	No	Si	80 nM	N/A

Ejemplo 3B: Resultado de ensayo basado en células para clones minimizados y parientes de primeras selecciones de dRmY

[00362] Se describen clones parientes de la selección dRnY en el ejemplo 1C, y clones dRmY minimizados de esta selección (descrita en el ejemplo 2A.2), se prueban para actividad utilizando el ensayo de activación STAT3 transAM™. Los tres clones dRmY de longitud completa descritos en el ejemplo 1C que muestran la mayor afinidad de unión para IL-23, ARC489 (SEQ ID NO 91), ARC490 (SEQ ID NO 92), ARC491 (SEQ ID NO 94) ARC 492 (SEQ ID NO 97) se ensayan. El ARC 492 (SEQ ID NO 97)

que no exhibe unión para el IL-23 se utiliza como control negativo. El ARC489 (SEQ ID NO 91), y ARC491 (SEQ ID NO 94) muestran .actividad basadas en células comparables en el ensayo de activación STAT3 TransAM7 y los datos preliminares indican IC_{50} en el rango del 50nM-500 nM (datos no mostrados).

[00363] El clon solo minimizado de los esfuerzos de minimización dRmY descritos en el ejemplo 2A.2 que muestran unión al IL-23, ARC527 (SEQ ID NO 159), se prueba en el ensayo de activación STAT3 TransAM™ y muestran una reducción en el ensayo de actividad comparado con su ARC489 de longitud completa respectivo (SEQ ID NO 91) (datos no mostrados).

Ejemplo 3C: Resultados de ensayo basados en células para clones minimizados y parientes de segunda dRmY

[00364] Clones parientes de la selección dRmY descrita en el ejemplo 1D, y clones minimizados de esta selección (descrita en el ejemplo 2A.3) que exhiben alta afinidad con el hIL-23 se seleccionan para funcionalidad en el ensayo TransAM™ utilizando una titulación IL-23 de 8 puntos de 0 a 3μM en dilusiones de 3 pliegues en combinación con una concentración IL-23 constante de 3 ng/mL. IC_{20}s para los clones de longitud completa se calculan a partir de las curvas de respuesta de dosis. En la Figura 22 es un ejemplo de las curvas de respuesta de dosis para los clones dRmY de la selección descrita en el ejemplo 1D que exhibe actividad

basada en células en el ensayo TransAM™ ARC611 (SEQ ID NO 103), ARC614 (SEQ ID NO 105), ARC621 (SEQ IDNO 108), y ARC627 (SEQ ID NO I lO)).

[00365] Clones dRmY minimizados (descritos en el ejemplo 2ª.3) se seleccionan para funcionalidad y se compara con su respectivo clon pariente en el ensayo TransAM™. Se calcula el IC_{50} de las curvas de respuesta de dosis. La figura 23 es un ejemplo de las curvas de respuesta de dosis para algunos de los clones dRmY minimizados más potentes, ARC979 (SEQ ID NO 177), ARC980 (SEQ ID NO 178), ARC982 (SEQ ID NO 180), comparado con los clones de longitud completa parientes ARC621 (SEQ ID NO 108) y ARC627 (SEQ ID NO 110). El ARC979 (SEQ ID NO 177), desarrolla consistentemente el mejor en el ensayo TransAm™, con un IC_{50} de 40nM +/- 10nM cuando se promedia sobre el curso de los tres experimentos. ARC792 (SEQ ID NO 162), ARC794 (SEQ ID NO 164), ARC795 (SEQ ID NO 165) también exhiben potente actividad en el ensayo TransAM™.

Ejemplo 3D: Resultados de ensayo basados en células para derivados de ARC979 optimizados

[00366] Varios de los derivados ARC979 optimizados descritos en el ejemplo 2B.2 que exhiben alta afinidad para el hIL-23 se seleccionan por su capacidad de inhibir el IL-23 inducido por activación de STAT 3 utilizando el ensayo Blast PHA descrito previamente. La inhibición de la fosforilación de STAT3 inducido por IL-23 se mide utilizando Pathscan®

554

fosfo- STAT3 (Tyr705) ELISA Kit Sandwich (Cell Signaling Technology, Beverly, MA).

[00307] De forma similar al método de ensayo TransAM™ descrito previamente, el kit ELISA de sándwich Pathscan® fosfo-STAT3 (Tyr705) detecta niveles endógenos de proteína fosfo-STAT3 (Tyr 705) utilizando un anticuerpo monoclonal de conejo STAT3 que se ha recubierto en los pozos de una placa de 96 pozos. Después de incubación con lisatos de células, ambas proteínas no fosfo-y fosfo-STAT3 capturan por el anticuerpo recubierto. Un anticuerpo monoclonal de ratón fosfo-STAT3 se agrega para detectar la proteína fosfo-STAT3 capturada, y un anticuerpo anti ratón ligado al HRP se utiliza entonces para el reconocimiento del anticuerpo para reconocer la detección. El sustrato HRP, TMB se agrega para desarrollar color, y la magnitud de la densidad óptica para este color desarrollado es proporcional a la cantidad de proteína fosfo-STAT3.

[00368] Se asilan blastos THA y se preparan como se describió anteriormente y se tratan con HIL-23 en una concentración constante final de 6ng/mL (R&D Systems, Minneapolis, MN) para inducir activación STAT3, en cambio de utilizar 3ng/mL, como se describió previamente con el ensayo TransAM™. Varios clones de la selección descrita en 2C, se seleccionan al utilizar una titulación IL-23 de 6 puntos de 0 a 700 nM en dilusiones de 3 pliegues en combinación con una

555

constante de concentración IL-23 de 6 ng/mL de IL-23 (R&D Systems, Minneapolis, MN) para inducir la activación del STAT3, en cambio de utilizar 3 ng/mL como se describió previamente con el ensayo TransAM™. Lisatos de célulastratadas se preparan utilizando los amortiguadores suministrados por el kit pathscan, y los ensayos se corren de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El IC_{50} para los clones de longitud completa se calculan a partir de las curvas de respuesta de dosis.

[00369] El ARC979 que exhibe un IC_{50} de 40+/- 10 mN utilizando el método TransAM™, exhibe consistentemente un IC_{50} de 6+/- 1nM utilizando el método pathscan®. Como se mencionó previamente este valor IC_{50} es consistente con el valor K_D para el ARC979 de 1nM que se verifica repetidamente bajo las condiciones de ensayo de unión directa descritas en el ejemplo 2B.2. Como se puede ver a partir de la tabla 36, varios de los derivados optimizados del ARC979 exhiben en forma destacada a una potencia mayor que el ARC979 cuando se compara directamente utilizando el método pathscan®, particularmente ARC1624 y ARC1625, que pueden dar valores IC_{50} de 2nM y 4nM respectivamente.

[00370] La Figura 24 es un ejemplo de las curvas de respuesta de dosis para varios clones optimizados que exhiben alta afinidad para IL-23 y potente actividad basada en célula en el ensayo pathscan®. La tabla 36 resume el IC_{50} de las

556

curvas de respuesta de dosis para los aptámeros optimizados ensayados.

[00371] Tabla 36: IC_{50} para derivados de ARC979 optimizados en el ensayo pathscan^{R}

SEQ ID NO	Clon	Pathscan^{R} IC_{50} (nM)
177	979	6+/-1
275	1544	———
308	1622	9
309	1623	5
310	1624	2
311	1625	4
312	1626	12
313	1755	68
314	1756	19

Ejemplo 3E: Resultados de ensayo basados en células para clones minimizados y parientes de las selecciones de ratón IL-23

[00372] Utilizando el ensayo blast PHA y el métod TransAM™ descrito anteriormente se muestran el IL-23 de ratón para activar el STAT3 en blastos de pH humano (ver figura 25). Por lo tanto, la capacidad de los clones pariente de la selección IL-23 de ratón descrita en el ejemplo 1E, y los

clones minimizados (descrita en el ejemplo 2 A.4) que exhiben afinidad para el MIL-23 para bloquear el IL-23 de ratón induce la activación STAT3 en células de blasto de THA humano se mide utilizando el ensayo TransAM™. El protocolo se utiliza idéntico a aquel previamente descrito excepto por el IL-23 de ratón que se utiliza para inducir la activación STAT3 en blastos THA en una concentración de 30 ng/mL, en cambio de utilizar IL-23 humano en una concentración de 3ng/mL. Los resultados para los clones pariente se listan en la tabla 37 y los resultados para los clones minimizados se listan en la tabla 38 adelante.

[00373] Tabla 37: la actividad del clon mIl-23-rRfY pariente en el ensayo TransAM™

SEQ ID NO	Nombre de clon	Selección	IC_{50} (nM)
124	ARC1628	R7 mIL-23	37
125	ARC1629	R7 mIL-23	No ensayado
126	ARC1630	R7 mIL-23S	16.6*
127	ARC1631	R7 mIL-23S	No ensayado
128	ARC1632	R7 mIL-23S	18
129	ARC1633	R7 mIL-23S	31
130	ARC1634	R7 mIL-23S	9

*Promedio de experimento múltiple

[00374] Tabla 38: Actividad de clon minimizada de IL-23 rRfY de ratón en el ensayo TransAM™

558

Clon minimizado SEQ ID NO	Clon pariente	IC_{50}mIL-23 (nM)
199	ARC1628	18 nM
200	ARC1632	inactivo
201	ARC1633	7
202	ARC1634	26

La invención será ahora descrita por vía de la descripción escrita y ejemplos, aquellos expertos en la técnica reconocerán que la invención se puede practicar en una variedad de modalidades y que la descripción y ejemplos anteriores son para propósito de ilustración y no de limitación de las siguientes reivindicaciones.

559

REIVINDICACIONES

Lo que se reivindica es:

1) Un aptámero que se une específicamente a IL-23.

2) El aptámero de la reivindicación 1, en donde IL-23 es una variante de IL-23 que desarrolla una función biológica que es esencialmente la misma como una función de IL-23.

3) El aptámero de la reivindicación 2 en donde la variante de IL-23 tiene substancialmente la misma estructura y substancialmente la misma capacidad para unir un aptámero como el IL-23.

4) El aptámero de la reivindicación 3, en donde IL-23 o una variante de este que comprende una secuencia de aminoácido que es al menos 70% idéntica a la secuencia que comprende las SEQ ID NOs 4 y 5.

5) El aptámero de la reivindicación 3, en donde IL-23 o una variante de este que comprende una secuencia de aminoácido que es al menos 80% idéntica a la secuencia que comprende las SEQ ID NOs 4 y 5.

6) El aptámero de la reivindicación 3, en donde IL-23 o una variante de este que comprende una secuencia de aminoácido que es al menos 90% idéntica a la secuencia que comprende las SEQ ID NOs 4 y 5.

7) El aptámero de la reivindicación 3, en donde IL-23 o una variante de este que tiene una secuencia de aminoácido que comprende las SEQ ID NOs 4 y 5.

8) El aptámero de la reivindicación 7, en donde el aptámero es ácido ribonucleico.

9) El aptámero de la reivindicación 8, en donde el aptámero es single stranded ácido ribonucleico.

10) El aptámero de la reivindicación 7, en donde el aptámero es deoxyácido ribonucleico.

11) El aptámero de la reivindicación 10, en donde el aptámero es ácido desoxiribonucleico de cadena sencilla.

12) El aptámero de la reivindicación 7, en donde el aptámero tiene una constante de disociación para IL-23 o una variante de este de aproximadamente 100 nM o menos.

13) El aptámero de la reivindicación 12, en donde el aptámero tiene una constante de disociación para IL-23 o una variante de este de aproximadamente 50 nM o menos.

14) El aptámero de la reivindicación 13, en donde el aptámero tiene una constante de disociación para human IL-23 o una variante de este de aproximadamente 10 nM o menos.

15) El aptámero de la reivindicación 14, en donde el aptámero tiene una constante de disociación para human IL-23 o una variante de este de aproximadamente 1 nM o menos.

16) Un aptámero de la reivindicación 7, en donde el aptámero comprende al menos una modificación química.

17) El aptámero de la reivindicación 16, en donde la modificación se selecciona del grupo que consiste de: de una sustitución química a una posición azúcar; una sustitución química a una posición fosfato; y una sustitución química a a una posición base, del ácido nucleico.

18) El aptámero de la reivindicación 16, en donde la modificación se selecciona del grupo que consiste de: incorporación de una modificación de nucleótido; taponamiento 3'; conjugación de un compuesto no inmunogénico, de alto peso molecular; conjugación de un compuesto lipofílico; y modificación de la estructura de fosfato.

19) El aptámero de la reivindicación 18, en donde el compuesto de alto peso molecular, no inmunogénico es polialquilen glicol.

20) El aptámero de la reivindicación 19, en donde el polialquilen glicol es polietilen glicol.

21) El aptámero de la reivindicación 18, en donde la estructura de modificación comprende la incorporación de uno o más fosfotionatos en la estructura fosfato.

22) El aptámero de la reivindicación 2, en donde el aptámero comprende la incorporación de menos de 10 fosfotionatos en la estructura de fosfato.

23) El aptámero de la reivindicación 22, en donde el aptámero comprende la incorporación de menos de 6 fosfotionatos en la estructura de fosfato.

24) El aptámero de la reivindicación 23, en donde el aptámero comprende la incorporación de menos de 3 fosfotionatos en la estructura de fosfato.

25) El aptámero de la reivindicación 7, en donde el aptámero modula una función de IL-23 o una variante de este.

26) El aptámero de la reivindicación 25, en donde el aptámero inhibe una función de IL-23 o una variante de este.

27) El aptámero de la reivindicación 26, en donde el aptámero inhibe una función de IL-23 o una variante de este in vivo.

28) El aptámero de la reivindicación 26, en donde el aptámero previene la unión de IL-23 al receptor IL-23.

29) El aptámero de la reivindicación 1 , en donde el aptámero tiene sustancialmente la misma capacidad para unir el IL-23 como aquel de un aptámero que comprende una secuencia de nucleótido seleccionada del grupo que consiste de: SEQ ID NOs 13-66, SEQ ID NOs 71-88, SEQ ID NOs 91-96, SEQ ID NOs 103-

118, SEQ ID NOs 124-134, SEQ ID NOs 135-159, SEQ ID NO 162, y SEQ ID NOs 164-172, SEQ ID NOs 176-178, SEQ ID NOs 181-196, y SEQ ID NOs 199-314.

30) El aptámero de la reivindicación 1, en donde el aptámero tiene substancialmente la misma estructura y substancialmente la misma capacidad para unir IL-23 como aquel de un aptámero que comprende una secuencia de nucleótido seleccionada del grupo que consiste de: las SEQ ID NOs 13-66, las SEQ ID NOs 71-88, las SEQ ID NOs 91-96, SEQ ID NOs 103-118, SEQ ID NOs 124-134, SEQ ID NOs 135-159, SEQ ID NO 162, y SEQ ID NOs 164-172, SEQ ID NOs 176-178, SEQ ID NOs 181-196, y SEQ ID NOs 199-314.

31) El aptámero de la reivindicación 1 , en donde el aptámero comprende una secuencia de nucleótido al menos 80% idéntica a una cualquiera de las secuencias seleccionadas del grupo que consiste de: SEQ ID NOs 13-66, SEQ ID NOs 71-88, SEQ ID NOs 91-96, SEQ ID NOs 103-118, SEQ ID NOs 124-134, SEQ ID NOs 135-159, SEQ ID NO 162, y SEQ ID NOs 164-172, SEQ ID NOs 176-178, SEQ ID NOs 181-196, y SEQ ID NOs 199-314.

32) El aptámero de la reivindicación 31 , en donde el aptámero de la secuencia de ácido nucleico es al

menos 90% idéntica a una cualquiera de las secuencias seleccionadas del grupo que consiste de: SEQ ID NOs 13-66, SEQ ID NOs 71-88, SEQ ID NOs 91-96, SEQ ID NOs 103-118, SEQ ID NOs 124-134, SEQ ID NOs 135-159, SEQ ID NO 162, y SEQ ID NOs 164-172, SEQ ID NOs 176-178, SEQ ID NOs 181-196, y SEQ ID NOs 199-314.

33) El aptámero de la reivindicación 1, en donde el aptámero comprende 20 nucleótidos contiguos que son idénticos a una secuencia de 20 nucleótidos contiguos en la región de secuencia única de una cualquiera de las secuencias seleccionadas del grupo de: SEQ ID NOs 13-66, SEQ ID NOs 71-88, SEQ ID NOs 91-96, SEQ ID NOs 103-118, SEQ ID NOs 124- 134, SEQ ID NOs 135-159, SEQ ID NO 162, y SEQ ID NOs 164-172, SEQ ID NOs 176-178, SEQ ID NOs 181-196, y SEQ ID NOs 199-314.

34) El aptámero de la reivindicación 33, en donde el aptámero comprende 8 nucleótidos contiguos que son idénticos a la secuencia de 8 nucleótidos contiguos en la región de secuencia única de una cualquiera de las secuencias seleccionadas del grupo de: SEQ ID NOs 13-66, SEQ ID NOs 71-88, SEQ ID NOs 91-96, SEQ ID NOs 103-118, SEQ ID NOs 124- 134, SEQ ID NOs 135-159, SEQ ID NO 162, y SEQ ID NOs 164-172,

SEQ ID NOs 176-178, SEQ ID NOs 181-196, y SEQ ID NOs 199-314.

35) El aptámero de la reivindicación 34, en donde el aptámero comprende 4 nucleótidos contiguos que son idénticos a la secuencia de 4 nucleótidos contiguos en la región de secuencia única de una cualquiera de las secuencias seleccionadas del grupo de: SEQ ID NOs 13-66, SEQ ID NOs 71-88, SEQ IDNOs 91-96, SEQ ID NOs 103-118, SEQ ID NOs 124- 134, SEQ ID NOs 135-159, SEQ ID NO 162, y SEQ ID NOs 164-172, SEQ ID NOs 176-178, SEQ ID NOs 181-196, y SEQ ID NOs 199-314.

36) Un aptámero capaz de unir IL-23 o una variante de este comprende una secuencia de nucleótido seleccionada del grupo que consiste de: SEQ ID NOs 13-66, SEQ ID NOs 71- 88, SEQ ID NOs 91-96, SEQ ID NOs 103-118, SEQ ID NOs 124-134, SEQ ID NOs 135-159, SEQ ID NO 162, y SEQ ID NOs 164-172, SEQ ID NOs 176-178, SEQ ID NOs 181-196, y SEQ ID NOs 199-314.

37) El aptámero de la reivindicación 36, comprende adicionalmente al menos una modificación química.

38) El aptámero de la reivindicación 37, en donde la modificación se selecciona del grupo que consiste de: de una sustitución química a una posición azúcar; una sustitución química a una posición fosfato; y una sustitución química a a una posición base, del ácido nucleico.

39) El aptámero de la reivindicación 37, en donde la modificación se selecciona del grupo que consiste de: incorporación de una modificación de nucleótido; taponamiento 3'; conjugación de un compuesto no inmunogénico, de alto peso molecular; conjugación de un compuesto lipofílico; y modificación de la estructura de fosfato.

40) El aptámero de la reivindicación 39, en donde el compuesto no inmunogénico, de alto peso molecular es polialquilen glicol.

41) El aptámero de la reivindicación 40, en donde el polialquilen glicol es polietilen glicol.

42) El aptámero de la reivindicación 39, en donde la estructura de modificación comprende la incorporación de uno o más fosfotionatos en la estructura fosfato.

43) El aptámero de la reivindicación 42, en donde el aptámero comprende la incorporación de menos de 10 fosfotionatos en la estructura de fosfato.

44) El aptámero de la reivindicación 43, en donde el aptámero comprende la incorporación de menos de 6 fosfotionatos en la estructura de fosfato.

45) El aptámero de la reivindicación 44, en donde el aptámero comprende la incorporación de menos de 3 fosfotionatos en la estructura de fosfato.

46) El aptámero de la reivindicación 1, adicionalmente es capaz de unir al IL- 12.

47) El aptámero de la reivindicación 46, en donde IL-12 es una variante de IL- 12 que desarrolla una función biológica que es esencialmente la misma como una función de IL-12.

48) El aptámero de la reivindicación 47 en donde la variante de IL-12 tiene substancialmente la misma estructura y substancialmente la misma capacidad para unir un aptámero como el IL-12.

49) El aptámero de la reivindicación 48, en donde IL-12 o una variante de este que comprende una secuencia

de aminoácido que es al menos 80% idéntica a la secuencia que comprende las SEQ ID NOs 4 y 6.

50) El aptámero de la reivindicación 48, en donde IL-12 o una variante de este que comprende una secuencia de aminoácido que es al menos 90% idéntica a la secuencia que comprende las SEQ ID NOs 4 y 6.

51) El aptámero de la reivindicación 48, en donde IL-12 o una variante de este que tiene una secuencia de aminoácido que comprende las SEQ ID NOs 4 y 6.

52) El aptámero de la reivindicación 51, en donde el aptámero modula una función de IL- 12 o una variante de este.

53) El aptámero de la reivindicación 52, en donde el aptámero inhibe una función de IL- 12 o una variante de este.

54) El aptámero de la reivindicación 53, en donde el aptámero inhibe una función de IL-12 o una variante de este in vivo.

55) El aptámero de la reivindicación 53, en donde el aptámero previene la unión de IL- 12 al receptor IL-12.

56) El aptámero de la reivindicación 4, en donde IL-23 o una variante de este es IL-23 de ratón.

57) El aptámero de la reivindicación 56, en donde IL-23 de ratón que tiene una secuencia de aminoácido que comprende las SEQ ID NOs 315 y 316.

58) Una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de un aptámero que comprende una secuencia de nucleótido seleccionada del grupo que consiste de: SEQ ID NOs 13-66, SEQ ID NOs 71-88, SEQ ID NOs 91-96, SEQ ID NOs 103-118, SEQ ID NOs 124-130, SEQ ID NOs 135-159, SEQ ID NO 162, y SEQ ID NOs 164-172, SEQ ID NOs 176-178, SEQ ID NOs 181-196, y SEQ ID NOs 203-314, o una sal de estas, y un diluyente o portador farmacéuticamente aceptable.

59) Un método para tratar, prevenir o mejorar una enfermedad mediada por IL-23, que comprende administrar la composición de la reivindicación 58 a un vertebrado.

60) El método de la reivindicación 59, en donde el vertebrado es un mamífero.

61) El método de la reivindicación 60, en donde el mamífero es un humano.

62) El método de la reivindicación 59, en donde dicha enfermedad es seleccionada del grupo que consiste de: enfermedad autoinmune, enfermedad inflamatoria, cáncer, reabsorción de hueso en osteoporosis, y Diabetes Tipo I.

63) El método de la reivindicación 62, en donde la enfermedad autoinmune es seleccionada del grupo que consiste de: esclerosis múltiple, artritis reumatoide, psoriasis, lupus eritematoso sistémico, y síndrome del intestino irritable.

64) El método de la reivindicación 62, en donde el cáncer se selecciona del grupo que consiste de: colon cáncer, cáncer de pulmón, y metástasis de pulmón.

65) El método de la reivindicación 63, en donde la enfermedad irritable se selecciona del grupo que consiste de Enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa.

66) Una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de un aptámero que comprende una secuencia de nucleótido

seleccionada del grupo que consiste de: SEQ ID NO 14, SEQ ID NOs 17-19, SEQ ID NO 21, SEQ ID NOs 27-32, SEQ ID NOs 34-40, SEQ ID NO 42, SEQ ID NO 49, SEQ ID NOs 60-61, SEQ ID NOs 91- 92, SEQ ID NO 94, y SEQ ID NOs 103-118, o una sal de estas, y un diluyente o portador farmacéuticamente aceptable.

67) Un método para tratar, prevenir o mejorar una enfermedad mediada por IL- 12, que comprende administrar la composición de la reivindicación 66 a un humano.

68) El método de la reivindicación 67, en donde dicha enfermedad es seleccionada del grupo que consiste de: enfermedad autoinmune, enfermedad inflamatoria, cáncer, reabsorción de hueso en osteoporosis, y Diabetes Tipo I.

69) El método de la reivindicación 68, en donde la enfermedad autoinmune se selecciona del grupo que consiste de: esclerosis múltiple, artritis reumatoide, psoriasis, lupus eritematoso sistémico, y síndrome del intestino irritable.

70) El método de la reivindicación 68, en donde el cáncer se selecciona del grupo que consiste de:

colon cáncer, cáncer de pulmón, y metástasis de pulmón.

71) El método de la reivindicación 69, en donde la enfermedad irritable se selecciona del grupo que consiste de Enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa.

72) Un método de diagnóstico que comprende poner en contacto un aptámero de la reivindicación 36 con una composición que se sospecha comprende IL-23 o una variante de este y detectar la presencia o ausencia de IL-23 o una variante de este.

73) Un aptámero de acuerdo a la reivindicación 36 para uso como un diagnóstico in Vitro.

74) Un aptámero de acuerdo a la reivindicación 36 para uso como un diagnóstico in vivo.

75) Un aptámero de acuerdo a la reivindicación 36 para uso en el tratamiento, prevención o mejoramiento de una enfermedad in vivo.

574

APTÁMEROS PARA LA FAMILIA CITOQUINA IL-12 HUMANA Y SU USO COMO TERAPÉUTICOS PARA ENFERMEDADES AUTOINMUNES.

RESUMEN

La presente invención suministra materiales y métodos para tratar la enfermedad auto inmune en la cual las citoquinas están involucradas en patogénesis. Los materiales y métodos de la presente invención son útiles en el tratamiento de enfermedades autoinmunes. Los materiales y métodos de la presente invención están dirigidos a ligandos de ácido nucleico capaz de unirse a las citoquinas IL-23 humana y/o IL-12 humana y modular así su actividad biológica y su utilidad como agentes terapéuticos inmunes, autoinmunes y para cáncer.

Figura 1

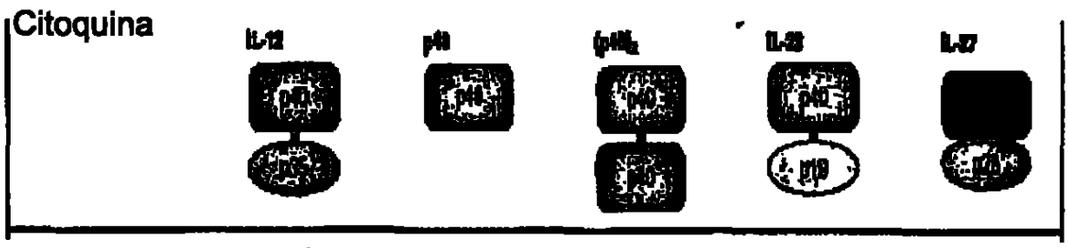


Figura 2

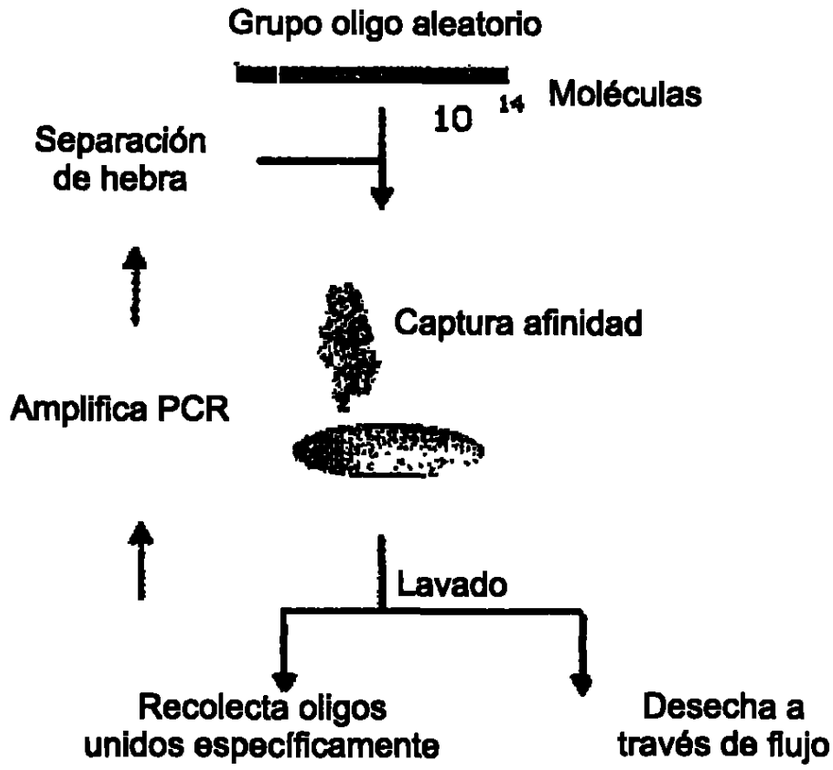


Figura 3

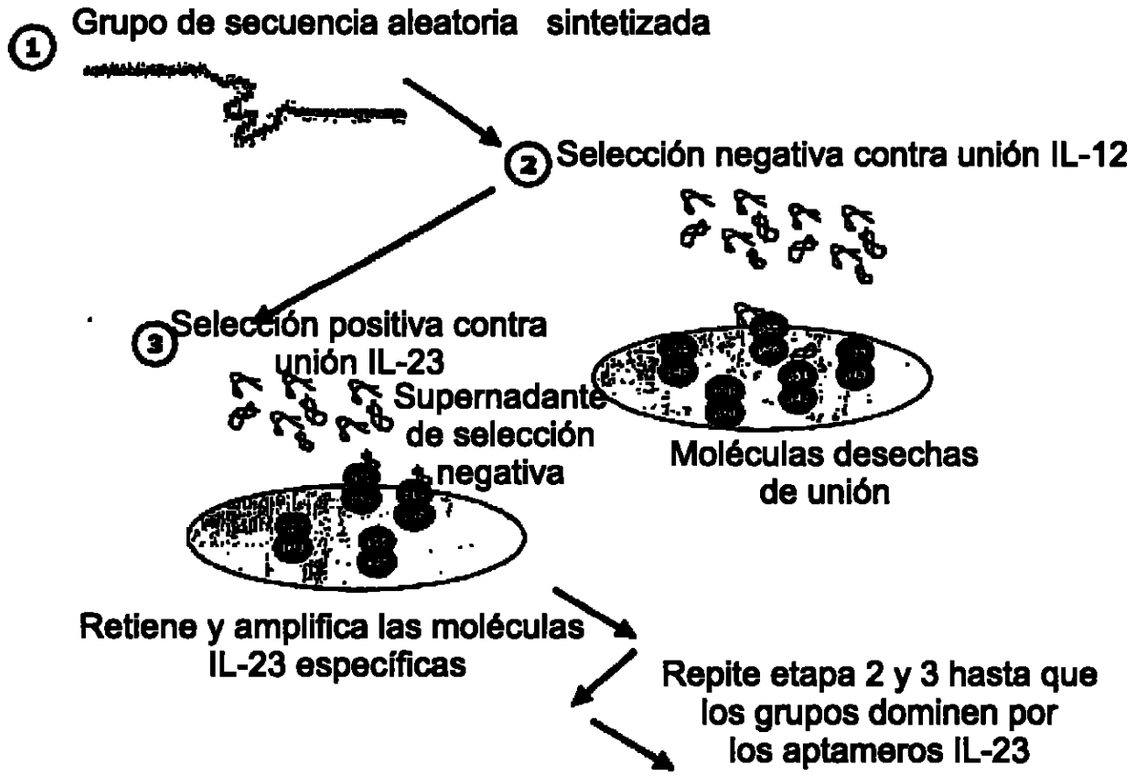

1
Grupo de secuencia aleatoria sintetizada
2
Selección negativa contra unión IL-12
3
Selección positiva contra unión IL-23
Supernadante de selección negativa
Moléculas desechas de unión
Retiene y amplifica las moléculas IL-23 específicas
Repite etapa 2 y 3 hasta que los grupos dominen por los aptameros IL-23

Figura 4

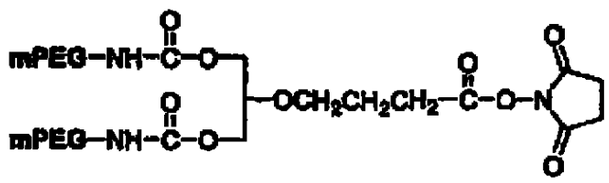


Figura 5

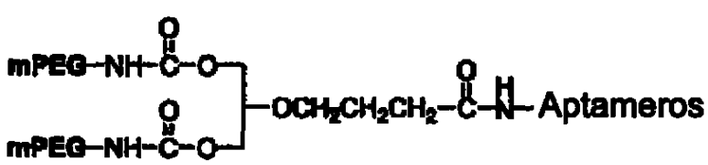


Figura 6

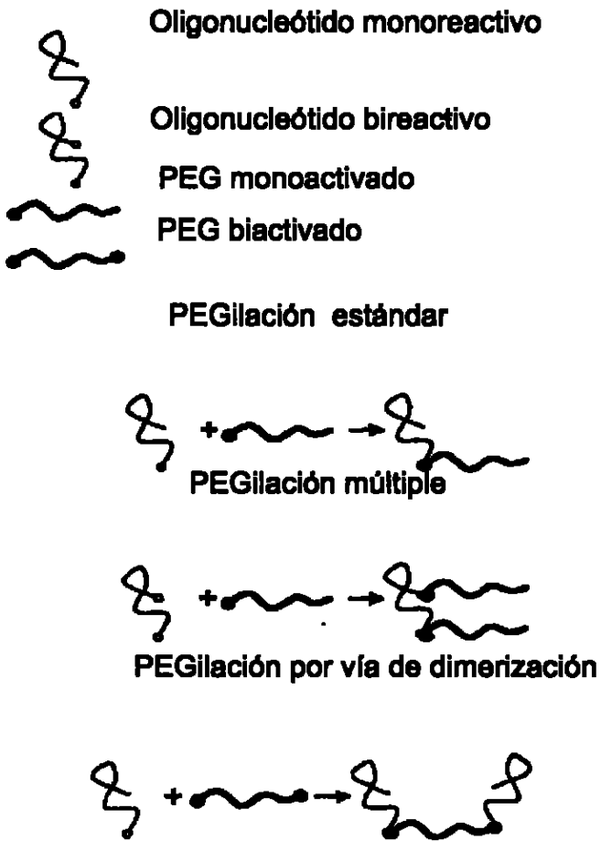

Oligonucleótido monoreactivo
Oligonucleótido bireactivo
PEG monoactivado
PEG biactivado
PEGilación estándar
PEGilación múltiple
PEGilación por vía de dimerización

Figura 7

Curva vinculante
IL 23 rRmY R12 rGmH R10

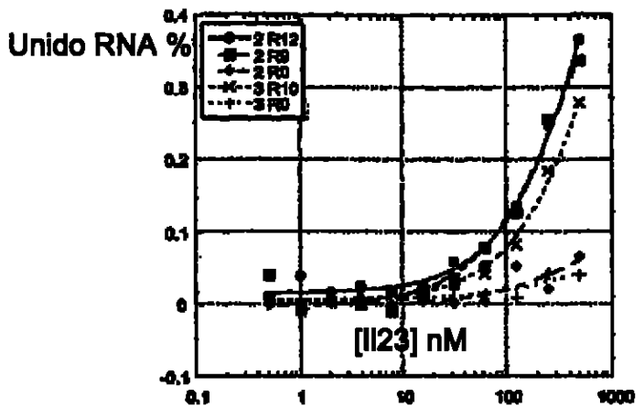
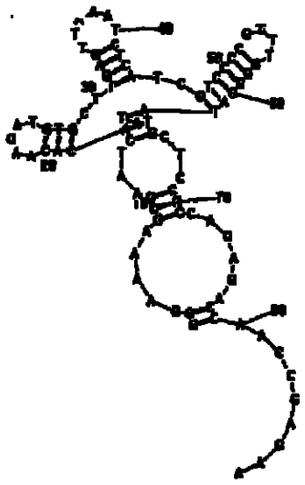
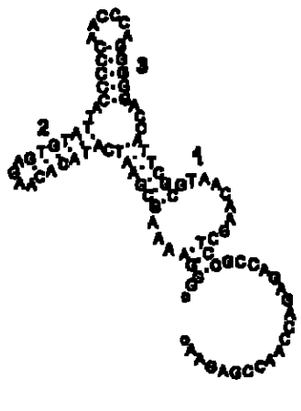


Figura 8

A)



B)



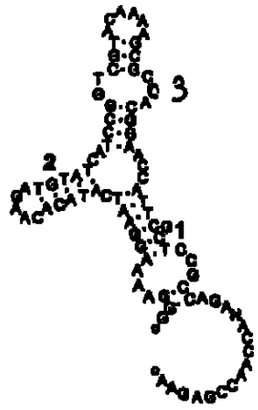


Figura 9

A)

SEQ ID NO 139



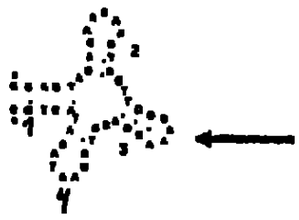
SEQ ID NO 140



SEQ ID NO 144



SEQ ID NO 145

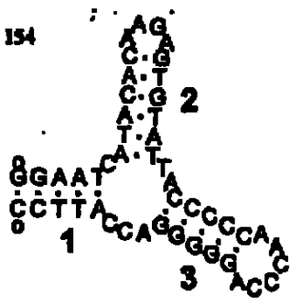


SEQ ID NO 147



B)

SEQ ID NO 154



SEQ ID NO 153

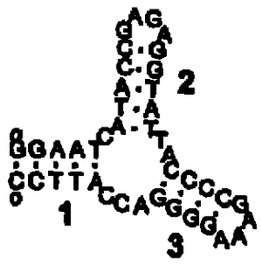
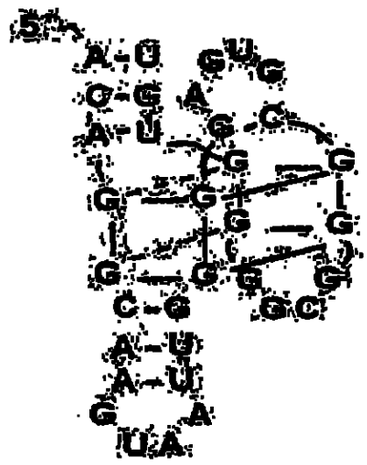


Figura 10



SEQ ID NO 177

Figura 11

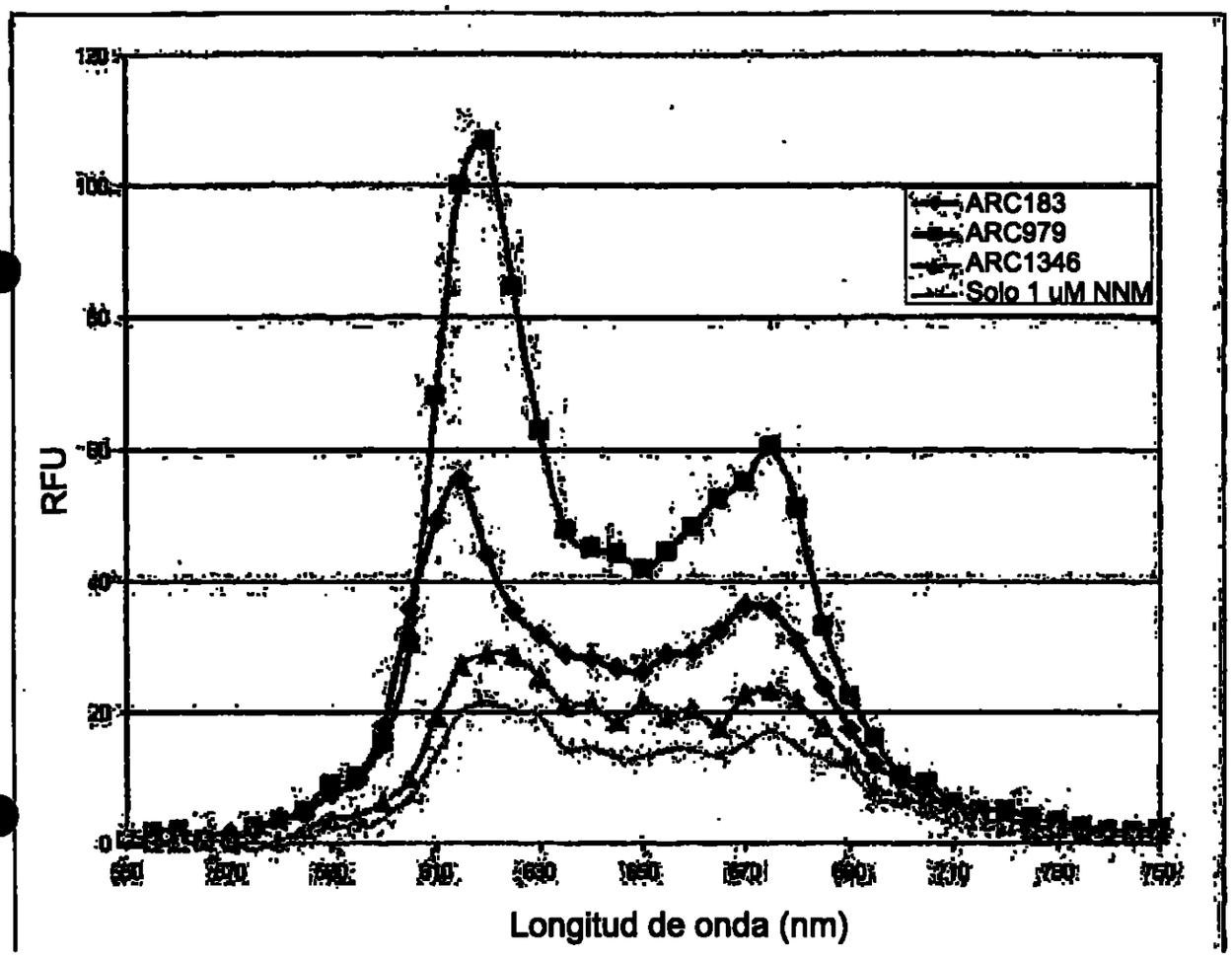


Figura 12

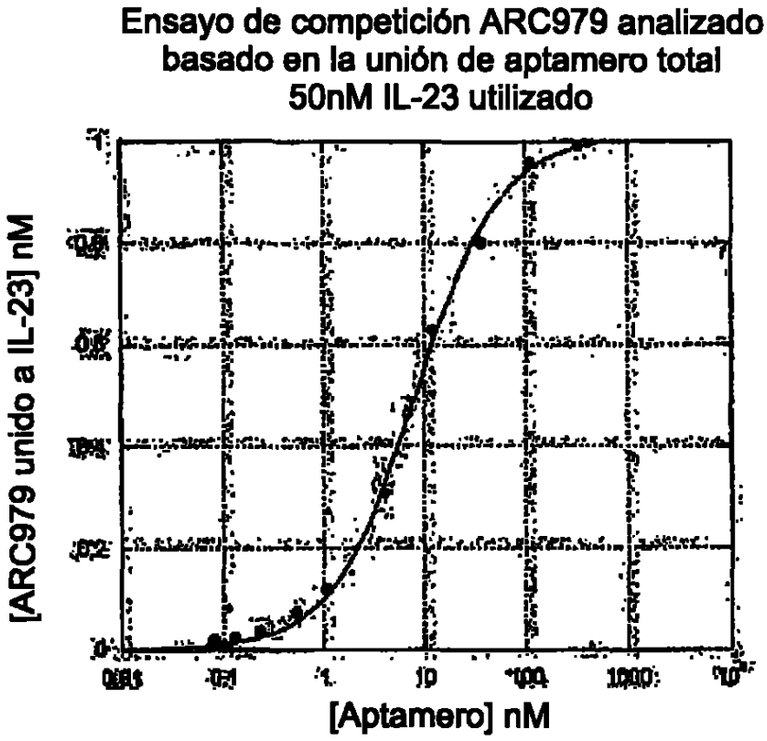

Ensayo de competición ARC979 analizado
basado en la unión de aptamero total
50nM IL-23 utilizado
[ARC979 unido a IL-23] nM
[Aptamero] nM

Figura 13

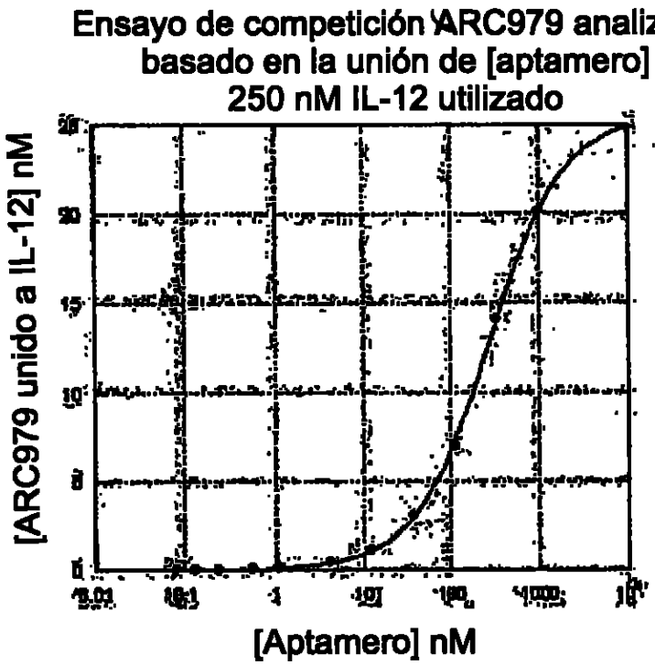

Ensayo de competición ARC979 analizado
basado en la unión de [aptamero]
250 nM IL-12 utilizado
[ARC979 unido a IL-12] nM
[Aptamero] nM

Figura 14

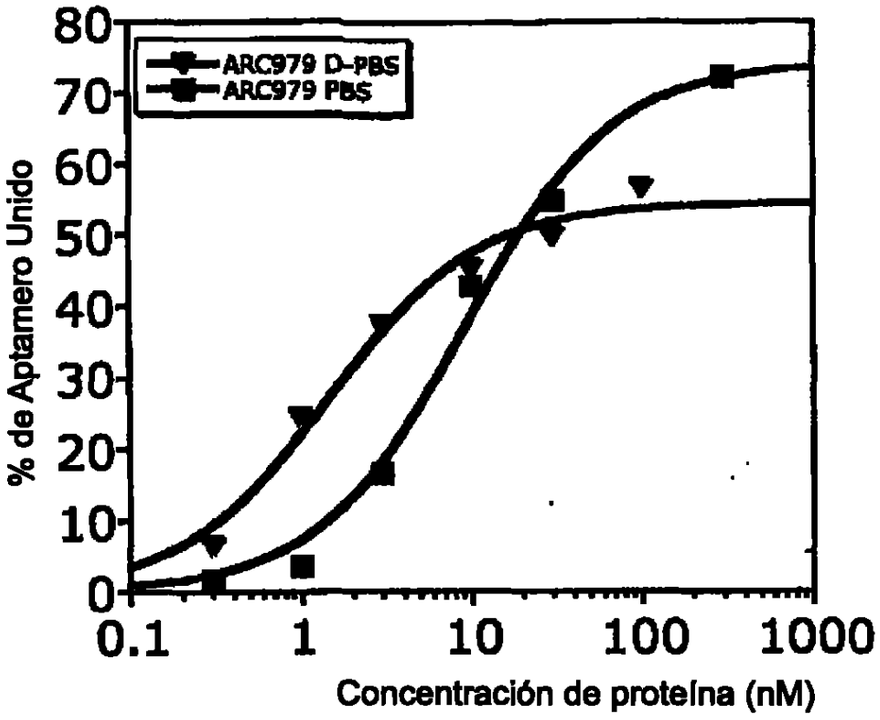

ARC979 D-PBS
ARC979 PBS
% de Aptamero Unido
0
10
20
30
40
50
60
70
80
0.1
1
10
100
1000
Concentración de proteína (nM)

Figura 15

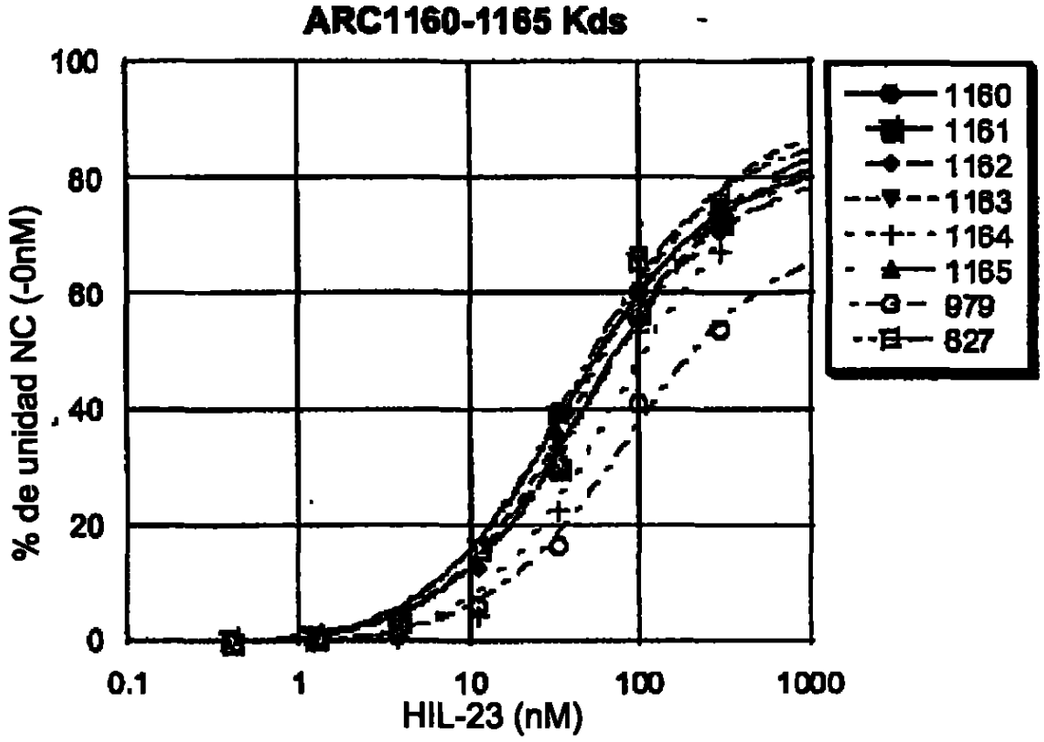

ARC1160-1165 Kds
% de unidad NC (-0nM)
100
80
60
40
20
0
0.1
1
10
100
1000
HIL-23 (nM)
1160
1161
1162
1163
1164
1165
979
827

Figura 16

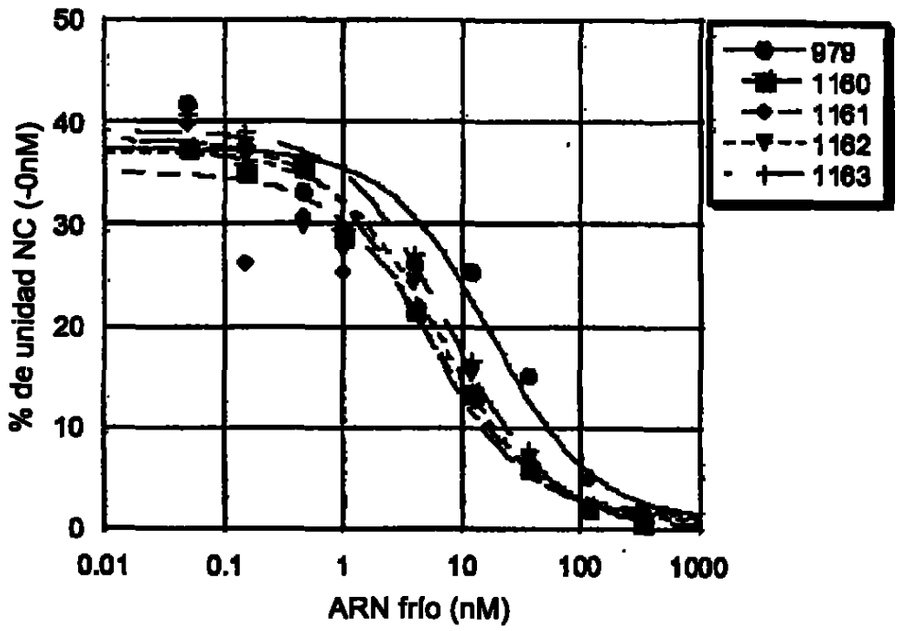

50
40
30
20
10
0
% de unidad NC (-0nM)
0.01
0.1
1
10
100
1000
ARN frío (nM)
979
1160
1161
1162
1163

Figura 17

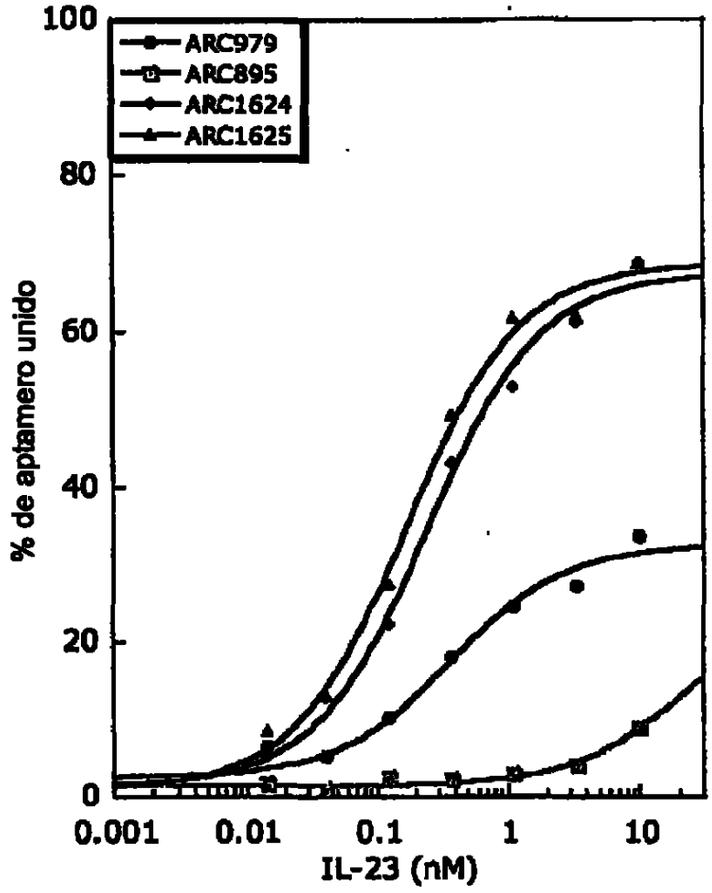

ARC979
ARC895
ARC1624
ARC1625
% de aptamero unido
100
80
60
40
20
0
0.001
0.01
0.1
1
10
IL-23 (nM)

Figura 18

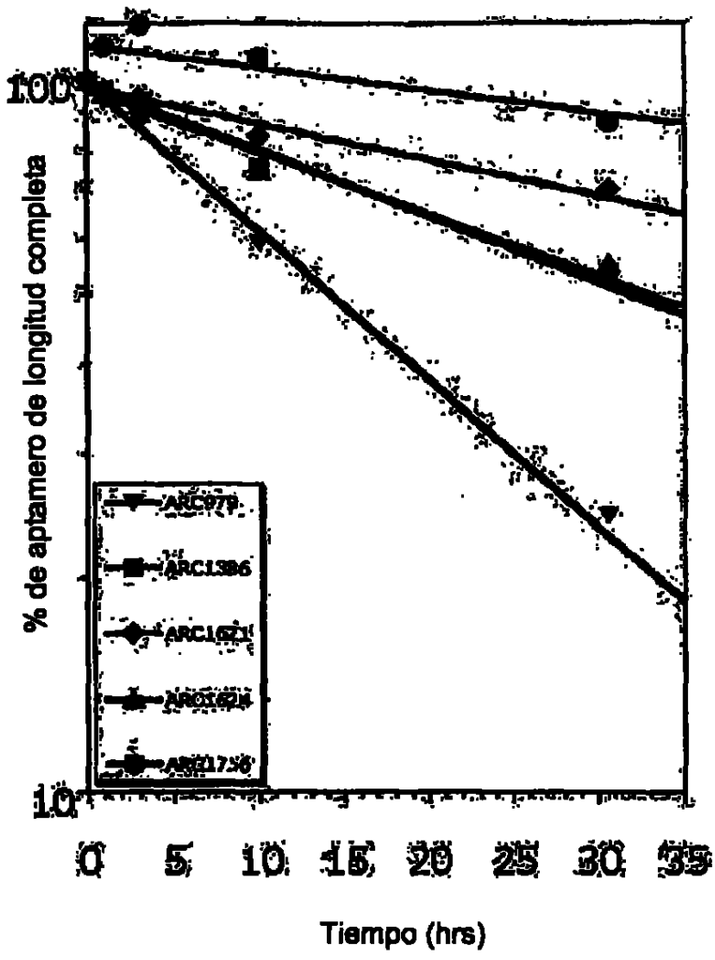

100
10
% de aptamero de longitud completa
ARC979
ARC1386
0 5 10 15 20 25 30 35
Tiempo (hrs)

Figura 19

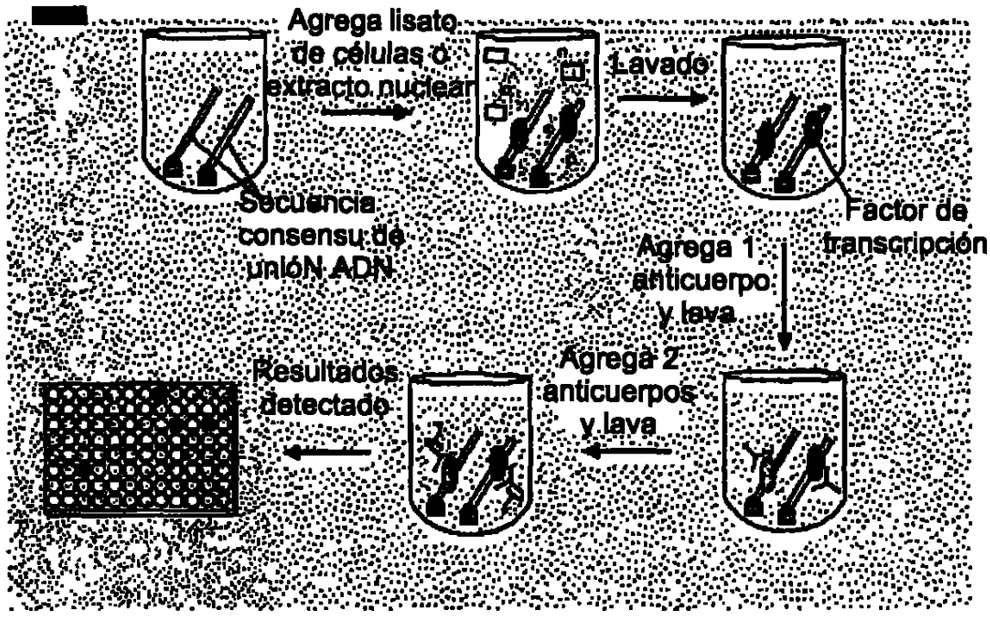
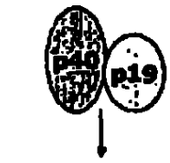

Agrega lisato de células o extracto nuclear
Lavado
Secuencia consensu de unión ADN
Factor de transcripción
Agrega 1 anticuerpo y lava
Agrega 2 anticuerpos y lava
Resultados detectado

Figura 20



IL-23

IL-12Rβ1 &IL-23R

•Aislado de PBMC de sangre utiliza celula mononuclear de cultivo gradienteFicoll
•Cultivo PBMC 3-5 días IL-2 (100 unidades/ml) y PHA (0.1ug/ml
•El suero priva de alimento a la celula
•Incuba 37°C bloquea calor aproximadamente 10-12 minutos
•Retiene reacción con/PBS enfriada con hielo/1.5 mM NaVO4
•ILisatos recolectados para ensayos estado trans-AM

Fosforilación Jak/Stat → Proliferación de activación de gen Interferón Gamma

Figura 21

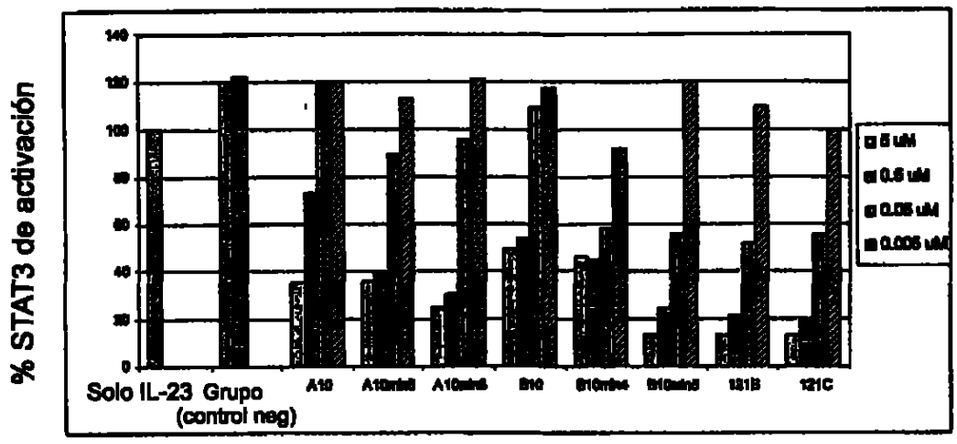

% STAT3 de activación
140
120
100
80
60
40
20
0
Solo IL-23 Grupo (control neg)
A10
A10mb8
A10mb5
B10
B10mb4
B10mb5
131B
121C
5 uM
0.5 uM
0.05 uM
0.005 uM

Figura 21

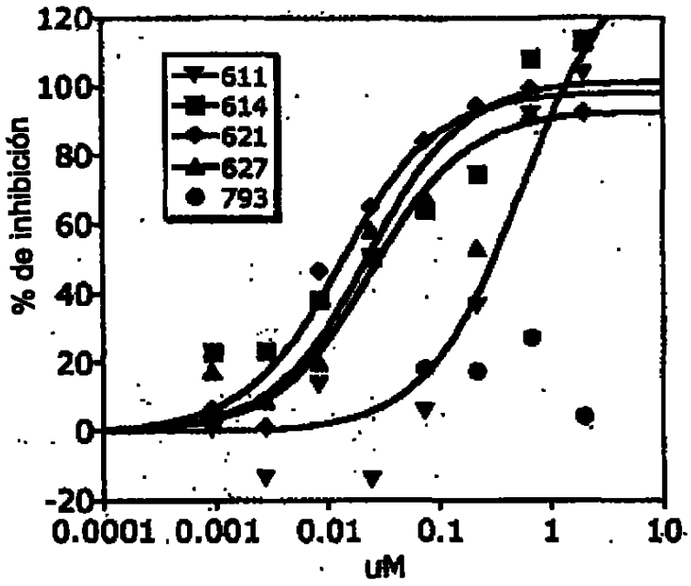

120
100
80
60
40
20
0
-20
% de inhibición
611
614
621
627
793
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
uM

Figura 23

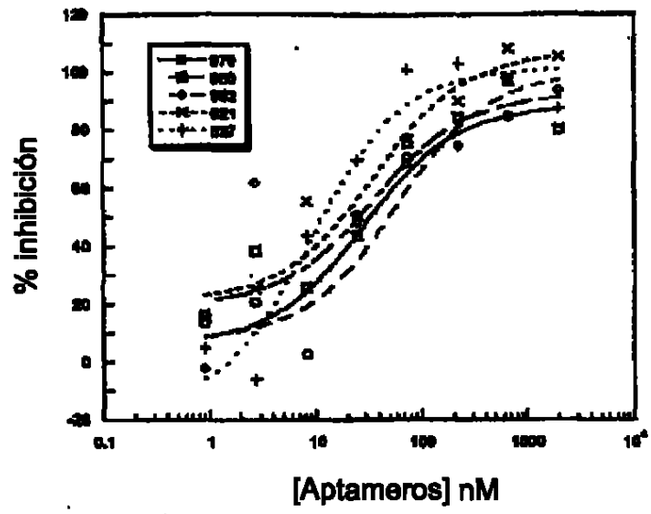


Figura 24

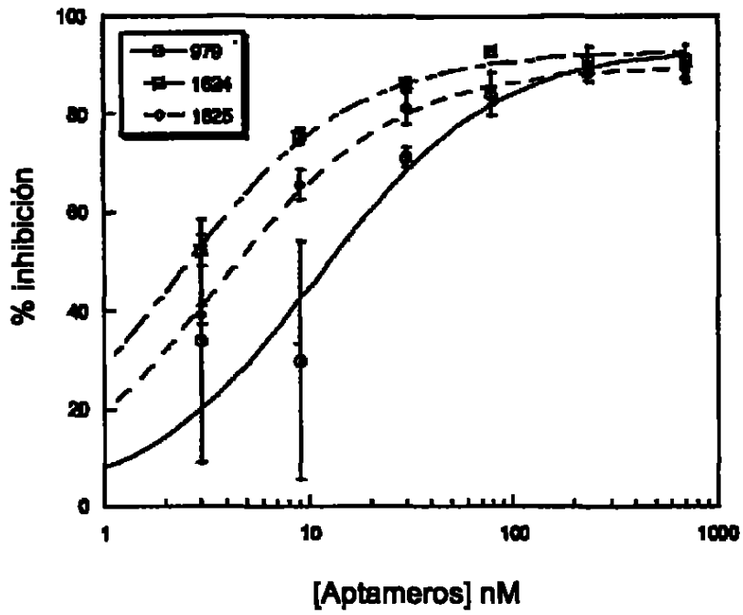
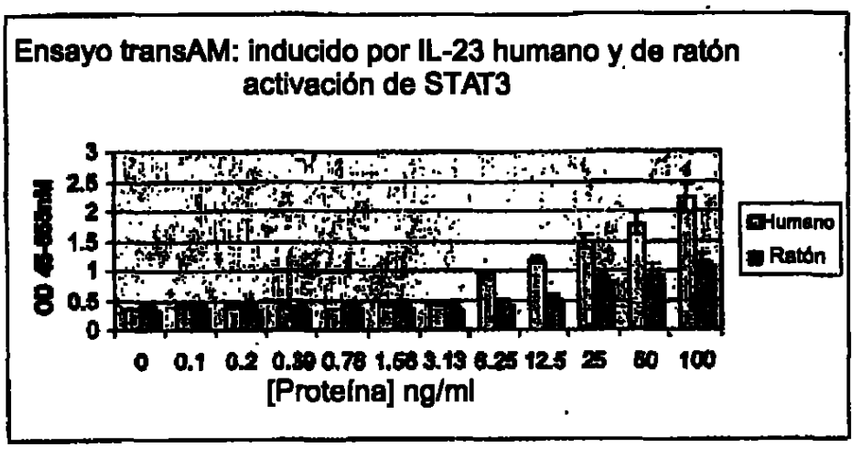

979
1624
1625
% inhibición
100
80
60
40
20
0
1
10
100
1000
[Aptameros] nM

Figura 25


Ensayo transAM: inducido por IL-23 humano y de ratón
activación de STAT3
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
0 0.1 0.2 0.39 0.78 1.56 3.13 6.25 12.5 25 50 100
[Proteína] ng/ml
Humano
Ratón

598
598

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 06-100210- -00000-0000
Fec: 2006-10-04 16:44:59 Dep: 2020 NUECREACIONES
Tra: 11 PATENTEIYII
Cla: 376 FASENACIONAL
Act 411 PRESENTACION Folios: 594
SUPERINTENDENCIA

REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE
PCT

PATENTE DE INVENCION [ ] MODELO DE UTILIDAD [ ]

- Indicación de que se solicita la concesión de 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 [ ]

COMPLETA [ ] INCOMPLETA [ ]

DISEÑO INDUSTRIAL [ ]

- Indicación de que se solicita el registro de 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 [ ]

- Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado [ ]
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud [ ]
- Representación gráfica del esquema trazado [ ]
- Comprobante de pago de las tasas establecidas [ ]

COMPLETA [ ] INCOMPLETA [ ]

Fdo B
Firma Responsable

Fecha 4 · oct · 6

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5, 7 y 10
Conmutador: 3 82 08 40
Fax: 350 62 20
E-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia

596
599

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 05-100710- -00000-0000
Fec 2005-10-04 15 44 08 Dep 2000 RECEPCIONES
Fra 11 PATENTES
Ene 370 FASENALIONALI
Act 411 PRESENTACION Folios 594

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL 05-10-06

1) SOLICITUD DE:

☒ Patente de invención ☐ Patente de Modelo de Utilidad

☒ Capitulo I. ☐ Capitulo II.

2) SOLICITANTE (71)	**Nombre: ARCHEMIX CORP.** **Dirección: One Hampshire Street, Cambridge, MA 02139 USA** **Nacionalidad o domicilio: Cambridge, MA, USA** **Lugar de constitución: MA, USA**	**IDENTIFICACIÓN** **C.C.** ☐ **NIT:** ☒ **C.E.** ☐ **OTRO** ☐ **Cual** _____ **NÚMERO** _____
	Teléfono: Fax: **E. Mail:**	
3) REPRESENTANTE O APODERADO	Nombre: DILIA MARÍA RODRÍGUEZ D´ALEMAN Dirección: Carrera 11 N°. 86-53 Piso 6 Bogotá D.C. Teléfono: 6181088 Fax: 6350824 E. Mail: info@clarkemodet.com.co	**IDENTIFICACIÓN** **C.C.** ☒ **NIT:** ☐ **C.E.** ☐ **OTRO** ☐ **NÚMERO:** 41.654.882 **TP:** 20824 CSJ
4) INVENTOR (ES) (72)	**Nombre: 1. DIENER, John,L; 2. FERGUSON, Alicia; 3. HAMAGUCHI, Nobuko; 4. KEENE, Sara Chesworth; 5. LAGASSE, H., A., Daniel; 6. SAWHNEY, Pooja; 7. THOMSON, Kristin.** **Dirección: 1. 87 Bristol Street, Unit 1B, Cambridge, MA 02139 USA; 2. 162 Summer Street #33, Somerville, MA 02143 USA; 3. 7 Dartmouth Drive, Framigham, MA 01701, USA; 4. 120 Lancaster Drive, Tewksbury, MA 01876 USA; 5. 112 Highland Avenue, Apt. F, Somerville, MA 02143 USA; 6. 276 Massachusetts Avenue, Apt.- 511, Arlington, MA 02474 USA; 7. 15 College Avenue, Arlington, MA 02474 USA** **Nacionalidad o Domicilio: Todos los anteriores, Estadounidenses**	

5) PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/US2005/007666 Fecha: Marzo 7, 2005

Publicación Internacional No. WO2005/086835 A2 Fecha: Sept. 22, 2005

6)Título (54) APTÁMEROS PARA LA FAMILIA CITOQUINA IL-12 HUMANA Y SU USO COMO TERAPÉUTICOS PARA ENFERMEDADES AUTOINMUNES

7) Clasificación Internacional: SIN CLASIFICACIÓN A61K 39/395 AC

8) PRIORIDAD SI ☒ NO ☐	**33) País de Origen**	**(32) Fecha**	**(31) Número de Solicitud**
	Estados Unidos	**Marzo 5, 2004**	**60/550,962 (CON)**
	Estados Unidos	**Sept. 7, 2004**	**60/608,046 (CON)**

9) Comprobante de pago N°: 06-133745 **Fecha:** Sept. 25/06

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario. Ver reverso de esta pagina

REIVINDICACIONES

Lo que se reivindica es:

1) Un aptámero que se une específicamente a IL-23.

2) El aptámero de la reivindicación 1, en donde IL-23 es una variante de IL-23 que desarrolla una función biológica que es esencialmente la misma como una función de IL-23.

3) El aptámero de la reivindicación 2 en donde la variante de IL-23 tiene substancialmente la misma estructura y substancialmente la misma capacidad para unir un aptámero como el IL-23.

4) El aptámero de la reivindicación 3, en donde IL-23 o una variante de este que comprende una secuencia de aminoácido que es al menos 70% idéntica a la secuencia que comprende las SEQ ID NOs 4 y 5.

5) El aptámero de la reivindicación 3, en donde IL-23 o una variante de este que comprende una secuencia de aminoácido que es al menos 80% idéntica a la secuencia que comprende las SEQ ID NOs 4 y 5.

598
607

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá,
2020

Doctor(a)
RODRIGUEZ DILIA MARIA

REFERENCIA	Radicación No.	6 100210
	Solicitud internacional	PCT/US2005/007666
	Fecha inicio fase nacional	05/10/2006
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	013891

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante. (Art. 26-k) Decisión 486.

2. La solicitud no contiene el poder debidamente otorgado, con el lleno de los requisitos exigidos por los artículos 63 y subsiguientes del Código de Procedimiento Civil. Adicionalmente, deberá presentar el documento que acredita la existencia y representación legal de la sociedad solicitante, cuando ésta fuere persona jurídica.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Unica No.10 de 2001.

ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 01 DIC. 2006
aalvarado