



Organizacion y
Digitalizacion CSA Ltda

BT

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

República de Colombia
Ministerio de Comercio, Industria y Turismo

Delegatura de Propiedad Industrial
División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD DE

PCT

PATENTE DE INVENCION
PCT ENTRADA EN FASE NACIONAL

09-54211

21. EXPEDIENTE No.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
INVENTARIO

54. TITULO: APTAMERO CONTRA MIDCINA Y USO DEL MISMO

52. CLASIFICACION INTERNACIONAL:

71. SOLICITANTE: RIBOMIC INC.

DOMICILIO: 16-13, Shirokanedai 3-chome, Minato-ku,
Tokyo 108-0071, JAPON

74. APODERADO: Dra. MARGARITA CASTELLANOS A.

22. BOGOTA, D.C., 27 MAYO 2009

Delegatura de Propiedad Industrial
División de Nuevas Creaciones

**REQUISITOS NECESARIOS PARA PRESENTACION Y AGILIZACION
DEL TRÁMITE**

	USUARIO	RADICADOR
PATENTE DE INVENCION (X) MODELO DE UTILIDAD ()	(X)	()
- Indicación de que se solicita la concesión de una patente	(X)	()
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud	(X)	()
- Descripción de la invención	(X)	()
- Dibujos de ser estos pertinentes	(X)	()
- Comprobante de pago de las tasas establecidas	(X)	()

COMPLETA (X) 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 ()

EZQUEMA DE TRAZADO ()

- 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 del Esquema de Trazado	()	()
- Comprobante de pago de las tasas establecidas	()	()

COMPLETA () INCOMPLETA ()

Firma responsable: _____

Fecha: _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-054211- -00000-0000

Fecha: 2009-05-27 13:39:43 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYII Eva: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 169

PETITORIO



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-054211- -00000-0000

Fecha: 2009-05-27 13:39:43 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 169FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTES
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

SOLICITUD DE:

①

☒ Patente de Invención.☐ Patente de Modelo de Utilidad.☒ Capítulo I☐ Capítulo II

②

SOLICITANTE (71)

Nombre: RIBOMIC INC.

Dirección: 16-13, Shirokanedai 3-chome,
Minato-ku, Tokyo 108-0071 -
JAPON

Nacionalidad o Domicilio: Tokyo - JAPON

Lugar de Constitución: JAPON

Teléfono:

Fax:

E-mail:

IDENTIFICACIÓN

C.C.



NIT



C.E.



Otro



Cual

Número

③

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: MARGARITA CASTELLANOS A.

Dirección: CALLE 94A No. 7A-09

Teléfono: 610 7420 Fax: 610 0706

E-mail: info@castellanosyco.com

IDENTIFICACIÓN

C.C.



NIT



C.E.



Otro



Cual

Número

39'779.654 TPA

70.819

④

INVENTOR (ES) (72)

VER ANEXO # 1

⑤

PCT (86)

Solicitud Internacional No.

PCT/JP2007/072099

Fecha

14/11/2007

Publicación Internacional No.

WO2008/059877 A1

Fecha

22/05/2008

⑥

Título (54)

APTAMERO CONTRA MIDCINA Y USO DEL MISMO

⑦

Clasificación Internacional (51)

C12N 15/09 A61K 38/00 A61P 43/00

⑧

Prioridad

(33) Pais de Origen

(32) Fecha

(31) Número de Solicitud

SI ☒NO ☐

JP

14/11/2006

2006-308482

⑨

Comprobantes de pago Nos.

09-38,078 y 09-38,079

Fecha

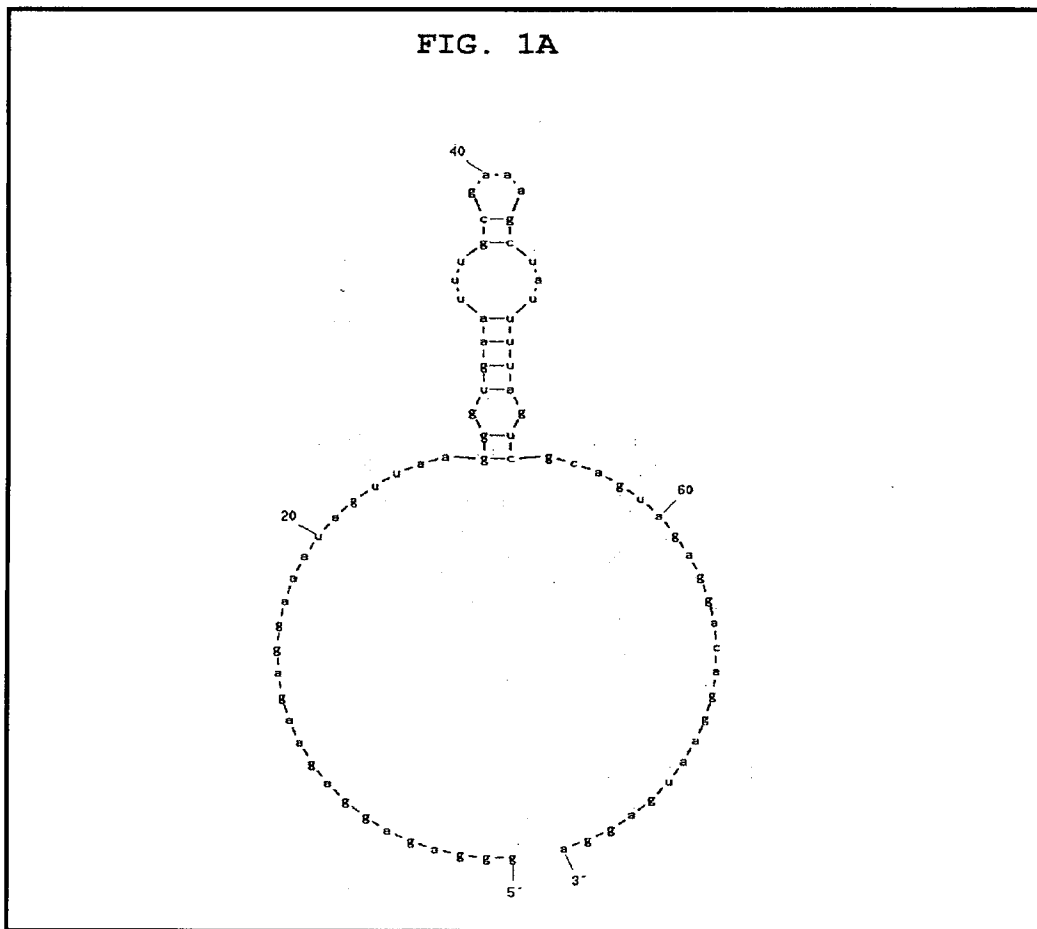
Mayo 22 de 2009

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

10 Anexos

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
- ☐ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☐ Poderes, si fuere el caso, junto con la sustitución del mismo a mi favor
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones.
- ☒ Copia de la solicitud internacional (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).
- ☐ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).
- ☐ Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- ☒ Arte final 12x12
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- ☒ Otros: Tarjeta Propietario, Extracto para la publicación y Forma PCT/IB304

11 FIGURA CARACTERISTICA:



12 Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE:

MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO

FIRMA:

Margarita Castellanos

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

27 JUN 2009

CASTELLANOS & CO LTDA

ABOGADOS
Calle 94 A No. 7 A-09
Bogotá, D.C. - COLOMBIA

ANEXO # 1
INVENTORES

1. **SHIN MIYAKAWA**
c/o RIBOMIC INC.
16-13, Shirokanedai 3-chome
Minato-ku
Tokyo 1080071, JAPON
2. **MASATOSHI FUJIWARA**
c/o RIBOMIC INC.
16-13, Shirokanedai 3-chome
Minato-ku
Tokyo 1080071, JAPON
3. **YOSHIKAZU NAKAMURA**
c/o THE UNIVERSITY OF TOKYO
3-1, Hongo 7-chome
Bunkyo-ku
Tokyo 1138654, JAPON
4. **TAKASHI MATSUI**
c/o 37-12-102, Minamiaoyama
Abiko-shi
Chiba 270-1178, JAPON
5. **SADATOSHI SAKUMA**
c/o 3-29-18, Yokodai, Isogo-ku
Yokohama-shi
Kanagawa 235-0045, JAPON

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-054211- -00000-0000

Fecha: 2009-05-27 13:39:43 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 169

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 09 - 38,078
FECHA : MAYO 22 DE 2009

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
ALVARO CASTELLANOS	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	105797506	22/05/2009	5,215,320.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	540,000.00
TOTAL :			\$ 540,000.00

SON: QUINIENTOS CUARENTA MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-054211- -00000-0000

Fecha: 2009-05-27 13:39:43 Dep. 2020 NUECREACION
 Tra. 11 PATENTE IYII Eve: 378 FASENACIONAL
 Act. 411 PRESENTACION Folios: 169

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 09 - 38,079
 FECHA : MAYO 22 DE 2009

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
ALVARO CASTELLANOS	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	105797506	22/05/2009	5,215,320.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09	OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	54 INFORMACION DETALLADA DE UN TRAMI
			TOTAL : \$ 25,000.00

SON: VEINTICINCO MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2008年5月22日 (22.05.2008)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2008/059877 A1

(51) 国際特許分類:

C12N 15/09 (2006.01) A61P 43/00 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01) G01N 33/53 (2006.01)
A61P 9/00 (2006.01) G01N 33/566 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

ディングベンチャープラザ505号株式会社セルシ
グナルズ内 Kanagawa (JP). 佐久間 貞俊 (SAKUMA,
Sadatoshi) [JP/JP]; 〒2300046 神奈川県横浜市鶴見
区小野町75番1リーディングベンチャープラザ
505号株式会社セルシグナルズ内 Kanagawa (JP).

(21) 国際出願番号:

PCT/JP2007/072099

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

(22) 国際出願日:

2007年11月14日 (14.11.2007)

(25) 国際出願の言語:

日本語

(26) 国際公開の言語:

日本語

(30) 優先権データ:

特願 2006-308482

2006年11月14日 (14.11.2006) / JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会
社リボミック (RIBOMIC INC.) [JP/JP]; 〒1080071 東
京都港区白金台三丁目16番13号 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 宮川 伸
(MIYAKAWA, Shin) [JP/JP]; 〒1080071 東京都港区
白金台三丁目16番13号 株式会社リボミック
内 Tokyo (JP). 藤原 将寿 (FUJIWARA, Masatoshi)
[JP/JP]; 〒1080071 東京都港区白金台三丁目16番
13号 株式会社リボミック内 Tokyo (JP). 中村 義一
(NAKAMURA, Yoshikazu) [JP/JP]; 〒1138654 東京都
文京区本郷7丁目3番1号 国立大学法人 東京大学
内 Tokyo (JP). 松井 隆 (MATSUI, Takashi) [JP/JP]; 〒
2300046 神奈川県横浜市鶴見区小野町75番1リー

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

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可
能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD,
SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY,
KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG,
CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE,
IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, 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).

添付公開書類:

- 国際調査報告書
- 電子形式により別個に公開された明細書の配列表部
分、請求に基づき国際事務局から入手可能

(54) Title: APTAMER AGAINST MIDKINE AND USE THEREOF

(54) 発明の名称: ミッドカインに対するアプタマー及びその使用

(57) Abstract: It is intended to provide a high-quality aptamer against midkine. An aptamer having an inhibitory activity against midkine; a complex comprising an aptamer having a binding activity or an inhibitory activity against midkine and a functional substance (such as an affinity substance, a labeling substance, an enzyme, a drug delivery medium or a drug); a pharmaceutical, a cell migration inhibitor, a diagnostic agent and a labeling agent comprising an aptamer having a binding activity or an inhibitory activity against midkine, or a complex containing the aptamer and a functional substance; and the like.

(57) 要約: ミッドカインに対する良質なアプタマーを提供する。 ミッドカインに対する阻害活性を有するアプ
タマー; ミッドカインに対する結合活性又は阻害活性を有するアプタマー及び機能性物質 (例えば、親和性物質、
標識用物質、酵素、薬物送達媒体、又は薬物など) を含む複合体; ミッドカインに対する結合活性又は阻害活性を
有するアプタマー、又は当該アプタマー及び機能性物質を含む複合体を含む医薬、細胞遊走阻害剤、診断薬及び標
識剤など。

WO 2008/059877 A1

DESCRIPTION

APTAMER AGAINST MIDKINE AND USE THEREOF

[Technical Field]

[0001]

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

[Background of the Invention]

[0002]

10 Midkine (hereinafter abbreviated as "MK" as required) is a growth/differentiation factor that was first discovered as a gene product expressed transiently in the process of differentiation induction of embryonic tumor cells (EC) with retinoic acid, being a polypeptide having a molecular weight of 13kDa, rich in basic amino acids and cysteine (see, for example, 15 non-patent document 1 and non-patent document 2).

[0003]

 The steric structure of MK has been determined by NMR and reported (see, for example, non-patent document 3). When characterized structurally, MK is configured mainly with two 20 domains. Specifically, MK consists of a fragment on the N-terminal side consisting of amino acid residues 1 to 52 (hereinafter referred to as "the N-terminal fragment"), a fragment on the C-terminal side consisting of amino acid residues 62 to 121 (hereinafter referred to as "the C-terminal 25 fragment") and a loop region that connects the fragments (amino acid residues 53 to 61). Bound to the outside of each domain is a tail that is rich in basic amino acids. In the MK molecule, each of the N-terminal fragment and the C-terminal fragment has a steric structure consisting mainly of three 30 reversed β sheet structures (hereinafter referred to as "domains"; a domain consisting of the amino acid residues 15 to 52 in the N-terminal fragment referred to as "the N-domain", a domain consisting of the amino acid residue 62 to 104 in the C-terminal fragment referred to as "the C-domain"), and freely 35 moving structures assuming no particular structure (hereinafter

referred to as "tails"; a tail consisting of the amino acid residues 1 to 14 in the N-terminal fragment referred to as "the N-tail", and a tail consisting of the amino acid residues 105-121 in the C-terminal fragment referred to as "the C-tail").

5 [0004]

Known receptors of MK include receptor-type protein tyrosine phosphatase ζ (PTP ζ), LRP (low density lipoprotein receptor-related protein), ALK (anaplastic leukemia kinase), integrin and syndecan and the like. MK is a highly positively charged protein containing large amounts of the basic amino acids lysine (K) and arginine (R). It has a heparin-binding site in the C-domain thereof, and is known to bind strongly to negatively charged molecules such as heparin and chondroitin sulfate E. As a result of mutagenesis analysis and NMR analysis, it is thought that cluster I, configured with K79, R81, and K102, and cluster II, configured with K86, K87, and R89, are important to the binding with heparin. Meanwhile, a report that only cluster I is important to the binding with chondroitin sulfate E is available. When R81 of cluster I is replaced with A, the binding activity with heparin decreases. As a result, the reduction of the binding activity to PTP ζ and the MK-induced neurite elongation and movement of nerve cells are suppressed.

[0005]

Some growth factors such as fibroblast growth factor (bFGF) and vascular endothelial cell growth factor (VEGF) have a heparin-binding site. These growth factors are thought to bind to heparan sulfate proteoglycan, an extracellular matrix, stay at appropriate positions, and are released as required. The same are also known to bind to heparan sulfate expressed in nerve cells and vascular endothelial cells to contribute to neurite elongation and fibrinolytic activity elevation. When a Petri dish is coated with MK and mouse embryo nerve cells are sown thereon, neurites elongate. In this situation, digestion of the nerve cells with heparitinase suppresses the neurite

elongation. Meanwhile, when vascular endothelial cells are cultured and MK is added, the plasminogen Activator activity of the cells rises. In this case as well, digestion of the cells with heparitinase suppresses the elevation of plasminogen
5 activity.

[0006]

MK is thought to be bound with PTP ζ at two sites. One site involves a high affinity bond with chondroitin sulfate ($K_d = 0.58$ nM). This bond disappears upon digestion with
10 chondroitinase. The other site involves a bond with protein, being a low-affinity bond that remains after digestion with chondroitinase ($K_d = 3$ nM). MK promotes the migration of fetal nerve cells expressing PTP ζ ; treatment of the nerve cells with chondroitinase ABC suppresses the migration. Osteoblast-like
15 UMR106 cells are expressing PTP ζ , and are known to have the MK-dependent migration thereof suppressed by treatment with chondroitinase ABC. The MK-dependent migration of macrophage is also suppressed by treatment with chondroitinase ABC, chondroitinase B, or heparinase. Because macrophage is not
20 thought to express PTP ζ , is it thought that another receptor is involved.

[0007]

Whatever negatively charged does not bind to the heparin-binding site of MK. When MK was immobilized by aminocoupling
25 and subjected to surface plasmon resonance analysis, the results obtained showed that chondroitin sulfate E and heparin bound strongly to MK, whereas chondroitin sulfate A, B, C, and D did not bind thereto.

[0008]

30 MK is known to possess a broad range of biological activities. For example, it is known that in human cancer cells, the expression of MK is increased. This increased expression has been observed in a wide variety of cancers, including esophageal cancer, thyroid cancer, urinary bladder
35 cancer, colorectal cancer, gastric cancer, pancreatic cancer,

chest cancer, liver cancer, lung cancer, breast cancer, neuroblastoma, neuroblastoma, glioblastoma, uterine cancer, ovarian cancer, and Wilms' tumor (see, for example, patent document 1 and non-patent document 4). MK is also thought to
5 promote the survival and movement of cancer cells and facilitate neovascularization to help the advancement of cancer.
[0009]

 MK is also known to be one of the molecules that play the central role in the process of development of inflammation.
10 For example, it is known that the formation of nascent intima after blood vessel damage and the onset of nephritis in ischemic injury are mitigated in knockout mice lacking the MK gene. It is also known that in a rheumatism model, postoperative adhesion is also considerably mitigated in MK
15 knockout mice (see, for example, patent document 2, patent document 3 and patent document 4). Hence, MK is known to be involved in inflammatory diseases such as arthritis, autoimmune disease, rheumatic arthritis (rheumatoid arthritis (RA), osteoarthritis (OA)), multiple sclerosis, postoperative
20 adhesion, inflammatory colitis, psoriasis, lupus, asthma, and neutrophil functional abnormalities. Furthermore, MK is known to promote the movement (migration) of inflammatory cells such as macrophage and neutrophils. Because this movement is required for the development of inflammation, it is thought
25 that when midkine is lacked, inflammation-based diseases are unlikely to occur. (See, for example, patent document 5).
[0010]

 Since MK levels are increased in the peritoneal fluid of females with advanced endometriosis, and also since MK
30 stimulates the proliferation of cultured endometrial interstitial cells, MK is known to be involved in the onset and progression of endometriosis (see, for example, patent document 6).

[0011]

35 Furthermore, exhibiting vascular intimal thickening

action, MK is known to be involved in vascular obstructive diseases such as restenosis following vascular reconstruction surgery, cardiac coronary arterial vascular obstructive disease, cerebral vascular obstructive disease, renal vascular
5 obstructive disease, peripheral vascular obstructive disease, arteriosclerosis, and cerebral infarction (see, for example, patent document 2).

[0012]

Cell migration is known to be important to the mechanisms
10 for cancer cell infiltration/metastasis, intimal thickening in arteriosclerotic foci, neovascularization and the like. It is also known that inflammatory cell migration is profoundly associated with cardiovascular diseases such as angina pectoris, myocardial infarction, cerebral infarction, cerebral hemorrhage,
15 and hypertension.

[0013]

Pleiotrophin (PTN or HB-GAM) is the only family protein of the MK, having approximately 50% homology to MK. Both MK and PTN are proteins containing large amounts of cysteine and
20 basic residues. All the 10 cysteine residues are conserved in MK and PTN, and structurally, both can be divided into the N-domain and the C-domain. As a result of NMR analysis, it is known that these two molecules have very similar three-dimensional structures. Each domain consists of three β sheets,
25 connected via a flexible linker region. K79, R81, and K102, considered to be important to the binding with chondroitin sulfate and heparin, are conserved between the two proteins. K79 and R81 are present on the same β sheet, whereas K102 is present on another β sheet. When MK and PTN form a steric
30 structure, these basic residues appear in the vicinity of the protein surface.

[0014]

In recent years, applications of RNA aptamers to therapeutic drugs, diagnostic reagents, and test reagents have
35 been drawing attention; some RNA aptamers have already been in

clinical stage or in practical stage. In December 2004, the world's first RNA aptamer drug, Macugen, was approved as a therapeutic drug for age-related macular degeneration in the US. An RNA aptamer refers to an RNA that binds specifically to a target substance such as a protein, and can be prepared using the SELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment) method (non-patent documents 5, 6). The SELEX method is a method by which an RNA that binds specifically to a target substance is selected from about 10^{14} RNA pools having different nucleotide sequences. The RNA used has a structure wherein a random sequence of about 40 residues is sandwiched by primer sequences. This RNA pools are allowed to associate with a target substance, and only the RNA that has bound to the target substance is recovered using a filter and the like. The RNA recovered is amplified by RT-PCR, and this is used as the template for the next round. By repeating this operation about 10 times, an RNA aptamer that binds specifically to the target substance can be sometimes acquired.

[patent document 1] JP-A-6-172218

[patent document 2] WO2000/10608

[patent document 3] WO2004/078210

[patent document 4] WO2004/085642

[patent document 5] WO1999/03493

[patent document 6] WO2006/016571

[non-patent document 1] Kadomatsu, K. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 151:p.1312-1318

[non-patent document 2] Tomokura, M. et al., J. Biol. Chem, 265: p.10765-10770

[non-patent document 3] Iwasaki, W. et al., (1997) EMBO J. 16, p.6936-6946

[non-patent document 4] Muramatsu, T., (2002) J. Biochem. 132, p.359-371

[non-patent document 5] Ellington et al., (1990) Nature, 346, 818-822

[non-patent document 6] Tuerk et al., (1990) Science, 249, 505-

510

[Disclosure of the Invention]

[Problems to be Solved by the Invention]

[0015]

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

[Means of Solving the Problems]

[0016]

10 The present inventors investigated diligently to solve the problem described above, and, as a result, succeeded in preparing an aptamer of good quality for midkine, which resulted in the completion of the present invention.

[0017]

15 Accordingly, the present invention provides the following:

- [1] an aptamer possessing an inhibitory activity against midkine,
- [2] the aptamer of [1], wherein the aptamer does not possess an inhibitory activity against pleiotrophin,
- 20 [3] the aptamer of [1], possessing a binding activity to the N-terminal fragment of midkine,
- [4] the aptamer of [1], possessing a binding activity to the C-terminal fragment of midkine,
- [5] the aptamer of [2], possessing a binding activity to the N-
- 25 terminal fragment of midkine,
- [6] the aptamer of [2], possessing a binding activity to the C-terminal fragment of midkine,
- [7] an aptamer that exhibits an inhibitory activity against midkine by inhibiting the binding of midkine and PTP ζ ,
- 30 [8] the aptamer of [1], which is either (a) or (b) below:
 - (a) an aptamer comprising a nucleotide sequence selected from among SEQ ID NO:1 to 70 (with the provision that the uracil may be thymine), wherein the nucleotides contained in the aptamer are such that,
 - 35 (i) the 2'-positions of the pyrimidine nucleotides,

whether identical or different, are fluorine atoms or substituted by atoms or groups selected from the group consisting of hydrogen atoms, hydroxy groups and methoxy groups, and

5 (ii) the 2'-positions of the purine nucleotides, whether identical or different, are hydroxy groups or substituted by atoms or groups selected from the group consisting of hydrogen atoms, methoxy groups and fluorine atoms;

(b) an aptamer comprising a nucleotide sequence selected from
10 among SEQ ID NO:1 to 70 (with the provision that the uracil may be thymine), wherein one or several nucleotides are substituted, deleted, inserted or added, wherein the nucleotides contained in the aptamer are such that,

(i) the 2'-positions of the pyrimidine nucleotides,
15 whether identical or different, are fluorine atoms or substituted by atoms or groups selected from the group consisting of hydrogen atoms, hydroxy groups and methoxy groups, and

(ii) the 2'-positions of the purine nucleotides, whether
20 identical or different, are hydroxy groups or substituted by atoms or groups selected from the group consisting of hydrogen atoms, methoxy groups and fluorine atoms,

[9] the aptamer of any one of [1] to [8], wherein an nucleotide contained in the aptamer is modified,

25 [10] a complex comprising the aptamer of any one of [1] to [9] and a functional substance,

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

30 [12] a pharmaceutical drug comprising the aptamer of any one of [1] to [9] or the complex of [10] or [11],

[13] a cell migration inhibitor comprising the aptamer of any one of [1] to [9] or the complex of [10] or [11],

[14] a diagnostic reagent comprising the aptamer of any one of
35 [1] to [9] or the complex of [10] or [11],

11

[15] a labeling agent comprising the aptamer of any one of [1] to [9] or the complex of [10] or [11], and
[16] a method of detecting the aptamer of any one of [1] to [9] or the complex of [10] or [11].

5 [Effect of the Invention]

[0018]

The aptamer or the complex of the present invention can be useful as pharmaceutical drugs or reagents such as diagnostic reagents, for various diseases such as autoimmune
10 disease, cancer, postoperative adhesion, and endometriosis. The aptamer or the complex of the present invention can also be useful in purifying and concentrating MK, and detecting and quantifying MK.

[Brief Description of the Drawings]

15 [0019]

Fig. 1A shows one of the two secondary structures of RNA shown by SEQ ID NO:1 predicted by the MFOLD program.

Fig. 1B shows the other secondary structure of RNA shown by SEQ ID NO:1 predicted by the MFOLD program.

20 Fig. 2A shows one of the two secondary structures of RNA shown by SEQ ID NO:2 predicted by the MFOLD program, wherein the part enclosed in a square shows a consensus region.

Fig. 2B shows the other secondary structure of RNA shown by SEQ ID NO:2 predicted by the MFOLD program, wherein the part
25 enclosed in a square shows a consensus region.

Fig. 3A shows one of the two secondary structures of RNA shown by SEQ ID NO:3 predicted by the MFOLD program.

Fig. 3B shows the other secondary structure of RNA shown by SEQ ID NO:3 predicted by the MFOLD program, wherein the part
30 enclosed in a square shows a consensus region.

Fig. 4 shows the secondary structure of RNA shown by SEQ ID NO:4 predicted by the MFOLD program, wherein the part enclosed in a square shows a consensus region.

Fig. 5 shows the secondary structure of RNA shown by SEQ
35 ID NO:5 predicted by the MFOLD program.

Fig. 6 shows interactions between RNA shown by SEQ ID NO:5 and midkine, and between the RNA and human IgG1 (sensorgram obtained using BIAcore 2000).

Fig. 7 shows interaction between RNA shown by SEQ ID NO:4
5 and midkine (sensorgram obtained using BIAcore 2000).

Fig. 8 shows the secondary structure of RNA shown by SEQ ID NO:20 predicted by the MFOLD program.

Fig. 9 shows the secondary structure of RNA shown by SEQ ID NO:61 predicted by the MFOLD program.

10 [Best Mode for Embodying the Invention]
[0020]

The present invention provides an aptamer possessing a binding activity for midkine (MK). The aptamers of the present invention are capable of inhibiting activities of MK.

15 [0021]

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

[0022]

An inhibitory activity against MK means inhibition of any
25 biological activities of MK. As examples of the biological activities of MK, migration activities for cells (e.g., macrophages, neutrophils, eosinophils, vascular smooth muscle cells, tumor cells, osteoblasts, nerve cells and progenitor cells thereof) (Takada et al., 1997, J. Biochem. 122, 453-458,
30 Horiba et al., 2000, J. Clin. Invest. 105, 489-495, Maeda et al., 1999, J. Biol. Chem. 274, 12474-12479, Qi et al., 2001, J. Biol. Chem. 276, 15868-15875), proliferation and differentiation promotion activities for cells (e.g., tumor cells, fibroblasts, keratinocytes, nerve cells, chondrocytes
35 and progenitor cells thereof) (Muramatsu and Muramatsu, 1991,

Biochem. Biophys. Res. Commun. 177, 652-658, Muramatsu et al., 1993, Dev. Biol. 159, 392-402, Takei et al., 2001, Cancer Res. 61, 8486-8491), inhibitory activities against the proliferation and functions of regulatory T cells, elongation promotion
5 activities for nerve cell neurites, inhibitory activities against apoptosis of cells (e.g., tumor cells, nerve cells), neovascularization induction activities for cells (e.g., tumor cells), synapse formation induction activities for myoblasts, fibrinolytic system promotion activities for vascular
10 endothelial cells, IL-8 production promotion activities for vascular smooth muscle cells and the like can be mentioned. Therefore, as examples of inhibitory activities against MK, inhibitory activities against these activities can be mentioned.
[0023]

15 The aptamer of the present invention can possess inhibitory activities against MK derived from any mammals. As examples of such mammals, primates (e.g., humans, monkeys), rodents (e.g., mice, rats, guinea pigs), as well as companion animals, domesticated animals and work animals (e.g., dogs,
20 cats, horses, bovines, goat, sheep, pigs) can be mentioned.
[0024]

The aptamers of the present invention are not particularly limited, as far as they are capable of binding to an optionally chosen portion of MK to inhibit an activity
25 thereof; for example, by binding to the N-terminal fragment or C-terminal fragment of MK, the aptamers of the present invention are capable of inhibiting activities of MK. The amino acid sequence of human MK is shown by GenBank accession number BC011704, the secretory protein being configured with
30 121 amino acid residues from lysine 23 to aspartic acid 143. Generally, the lysine residue 23 is denoted by the amino acid residue at position 1. Human MK consists of an N-terminal fragment consisting of amino acid residues 1 to 52, a C-terminal fragment consisting amino acid residues 62 to 121 and
35 a loop region that connects the fragments, but the boundary of

the N-terminal fragment and the C-terminal fragment may be any loop portion of MK (53-61), and cannot be defined precisely.

[0025]

The length of the aptamer of the present invention is not
5 limited, and can usually be about 15 to about 200 nucleotides,
and can be, for example, not more than about 100 nucleotides,
preferably not more than about 80 nucleotides, more preferably
not more than about 60 nucleotides, most preferably not more
than about 45 nucleotides. The length of the aptamer of the
10 present invention may be, for example, not less than about 18,
20 or 25 nucleotides. If the total number of nucleotides is
smaller, chemical synthesis and mass-production will be easier,
and there is a major advantage in terms of cost. It is also
thought that chemical modification is easy, stability in the
15 body is high, and toxicity is low.

[0026]

Each of the nucleotides contained in the aptamer of the
present invention, whether identical or different, can be a
nucleotide comprising a hydroxyl group at the 2' position of
20 ribose (e.g., ribose of pyrimidine nucleotide) (i.e., an
unsubstituted nucleotide) or a nucleotide having the hydroxyl
group substituted by an optionally chosen atom or group at the
2' position of ribose. As examples of such an optionally
chosen atom or group, a nucleotide substituted by a hydrogen
25 atom, a fluorine atom or an -O-alkyl group (e.g., -O-Me group),
an -O-acyl group (e.g., -O-CHO group), or an amino group (e.g.,
-NH₂ group) can be mentioned. The aptamer of the present
invention can also be one wherein at least one kind (e.g., 1, 2,
3 or 4 kinds) of nucleotide comprises a nucleotide comprising a
30 hydroxyl group, or the above-described optionally chosen atom
or group, for example, at least two kinds (e.g., 2, 3 or 4
kinds) of groups selected from the group consisting of a
hydrogen atom, a fluorine atom, a hydroxyl group and an -O-Me
group, at the 2' position of ribose. In the aptamers of the
35 present invention, all nucleotides can be nucleotides

comprising a hydroxyl group, or an optionally chosen atom or group described above, for example, a group selected from the group consisting of a hydrogen atom, a fluorine atom, a hydroxyl group and an -O-Me group, at the 2'-position of ribose.

5 [0027]

An example of an aptamer of the present invention can have a potential secondary structure comprising one or more regions selected from the group consisting of single-strand regions (e.g., gggagaggaac), first stem regions (e.g., gacg and
10 complementary chains thereof), internal loop regions (e.g., aggagua and gg), second stem regions (e.g., gcc and complementary chains thereof), and internal loop regions (e.g., ggaaagaa). Another example of an aptamer of the present invention can have a potential secondary structure comprising
15 one or more regions selected from the group consisting of single-strand regions (e.g., gggaaggaggaa), first stem regions (e.g., gugcac and complementary chains thereof), internal loop regions (e.g., ag and gg), second stem regions (e.g., gg and complementary chains thereof), and internal loop regions (e.g.,
20 guuggug).

[0028]

As used herein, "potential secondary structure" refers to a secondary structure capable of occur stably under physiological conditions; for example, whether or not a
25 potential secondary structure is present can be determined using the structure prediction programs described in Examples. A stem region refers to a portion where a double strand is formed by a base pair in two or more continuous nucleotides (e.g., G-C, A-U, A-T). An internal loop portion refers to a
30 non stem region formed between two different stem regions. A hairpin loop region refers to a partial structure formed by one stem region, being a loop region formed on the opposite side to the 5' end and 3' end of an aptamer chain. A single-strand region refers to a terminal portion of a polynucleotide chain,
35 being a region that does not correspond to the above-described

stem region, internal loop region or hairpin loop region.

[0029]

The aptamers of the present invention can also have the capability of binding to the N-terminal fragment and/or C-terminal fragment of MK. The aptamer shown by SEQ ID NO:39 and altered forms thereof, like heparin and chondroitin sulfate E, exhibit high binding activity for the C-terminal fragment. Heparin is thought to bind to the C-terminal fragment at the cluster I and cluster II regions. Chondroitin sulfate E is thought to bind to the C-terminal fragment at the cluster I region. MK is known to interact with PTP ζ , which comprises chondroitin sulfate as a constituent molecule thereof. PTP ζ is expressed in fetal nerve cells and osteoblast-like cells, and in the presence of MK, the migration of these cells is promoted. In the present invention, an aptamer capable of binding to the C-terminal fragment to inhibit cell migration, and an aptamer that binds mainly to the N-terminal fragment to inhibit cell migration are provided.

[0030]

The aptamers of the present invention are also capable of inhibiting activities of MK (e.g., cell migration activity of MK), and can have the feature of being unable to inhibit an activity of PTN (e.g., cell migration activity of PTN). PTN is the only family protein of MK having a homology of 50%, they have very similar three-dimensional structures, and the amino acid residues important to the binding with chondroitin sulfate and heparin are conserved.

[0031]

The aptamer of the present invention can also be (a) an aptamer comprising a nucleotide sequence selected from one of SEQ ID NO:1 to 70 (but the uracil may be thymine), (b) an aptamer comprising a nucleotide sequence selected from one of SEQ ID NO:1 to 70 (but the uracil may be thymine) having one or more nucleotides substituted, deleted, inserted or added, or (c) a conjugate selected from the group consisting of a

conjugate of a plurality of units of (a) above, a conjugate of a plurality of units of (b) above, and a conjugate of a plurality of units of (a) and (b) above. In (b) above, the number of nucleotides substituted, deleted, inserted or added is not particularly limited, as long as it is several, and the number of nucleotides can be, for example, not more than about 30, preferably not more than about 20, more preferably not more than about 10, still more preferably not more than 5, most preferably 4, 3, 2 or 1. In (c) above, conjugation can be achieved by tandem binding. In the conjugation, a linker may be utilized. As the linker, nucleotide chains (e.g., 1 to about 20 nucleotides) and non-nucleotide chains (e.g., $-(CH_2)_n$ - linker, $-(CH_2CH_2O)_n$ - linker, hexaethylene glycol linker, TEG linker, peptide-containing linker, $-S-S-$ bond-containing linker, $-CONH-$ bond-containing linker, $-OPO_3-$ bond-containing linker) can be mentioned. The plurality as mentioned in the above-described plurality of conjugates is not particularly limited, as long as it is two or more, and the plurality can be, for example, 2, 3 or 4. Each of the nucleotides in (a) to (c) above, whether identical or different, can be a nucleotide comprising a hydroxyl group at the 2' position of ribose or a nucleotide having the hydroxyl group substituted by an optionally chosen group (e.g., hydrogen atom, fluorine atom or $-O-Me$ group) at the 2' position of ribose (e.g., ribose of pyrimidine nucleotide).

[0032]

In a particular aspect, the aptamers of the present invention are classifiable roughly into three kinds according to the structures thereof. A first aptamer is an aptamer consisting of the nucleotide sequence shown by SEQ ID NO:61 or a mutant thereof. An aptamer consisting of the nucleotide sequence shown by SEQ ID NO:61, when the secondary structure thereof is predicted by the MFOLD program, has the potential secondary structure shown in FIG. 9, being configured with a single-strand region, a first stem region, an internal loop

region, a second stem region , and a hairpin loop region. In this aptamer, substitution, deletion, insertion and/or addition of several nucleotides are acceptable in the single-strand region, firststem region, internal loop region, second stem
5 region, and hairpin loop region. For example, in this aptamer, insertion of several nucleotides into the single-strand region, insertion of several nucleotides into the first stem region, and addition of several nucleotides to the 3' end single-strand region (e.g., SEQ ID NO:5) are acceptable. Such an aptamer
10 binds more strongly to the N-terminal fragment than to the C-terminal fragment of MK.
[0033]

A second aptamer is an aptamer consisting of the nucleotide sequence shown by SEQ ID NO:20 or a mutant thereof.
15 An aptamer consisting of the nucleotide sequence shown by SEQ ID NO:20, the secondary structure predicted by the MFOLD program has the potential secondary structure shown in FIG. 8, being configured with a single-strand region, a first stem region, an internal loop region, a second stem region, and a
20 hairpin loop region. In this aptamer, substitution, deletion, insertion and/or addition of several nucleotides are acceptable in the single-strand region, first stem region, internal loop region, second stem region, , and hairpin loop region. For example, in this aptamer, addition of several nucleotides to
25 the single-strand region, the first stem region and/or the 3' end (e.g., SEQ ID NO:4) is acceptable. Such an aptamer exhibits almost no affinity for the N-terminal fragment of MK, and binds strongly to the C-terminal fragment.
[0034]

30 A third aptamer can be an aptamer consisting of the nucleotide sequence shown by SEQ ID NO:1 or a mutant thereof.
[0035]

The aptamer of the present invention may be one wherein a sugar residue (e.g., ribose) of each nucleotide has been
35 modified to increase the MK binding activity, stability, drug

deliverability and the like. As examples of the site to be modified in a sugar residue, one having the oxygen atom at the 2'-position, 3'-position and/or 4'-position of the sugar residue replaced with another atom, and the like can be mentioned. As examples of the modification, fluorination, O-alkylation (e.g., O-methylation, O-ethylation), O-arylation, S-alkylation (e.g., S-methylation, S-ethylation), S-arylation, and amination (e.g., -NH₂) can be mentioned. Such alterations in the sugar residue can be performed by a method known per se (see, for example, Sproat et al., (1991) Nucle. Acid. Res. 19, 733-738; Cotton et al., (1991) Nucl. Acid. Res. 19, 2629-2635; Hobbs et al., (1973) Biochemistry 12, 5138-5145).
[0036]

The aptamer of the present invention may also have a nucleic acid base (e.g., purine or pyrimidine) altered (e.g., chemical substitution) to increase the MK binding activity and the like. As examples of such alterations, 5-position pyrimidine alteration, 6- and/or 8-position purine alteration, alteration with an extracyclic amine, substitution with 4-thiouridine, and substitution with 5-bromo or 5-iodo-uracil can be mentioned. The phosphate group contained in the aptamer of the present invention may be altered to confer resistance to nuclease and hydrolysis. For example, the P(O)O group may be substituted with P(O)S (thioate), P(S)S (dithioate), P(O)NR₂ (amidate), P(O)R, R(O)OR', CO or CH₂ (formacetal) or 3'-amine (-NH-CH₂-CH₂-) [wherein each unit of R or R' is independently H or a substituted or unsubstituted alkyl (e.g., methyl, ethyl)].

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

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

An alteration can further be performed by adding to an end a polyethyleneglycol, amino acid, peptide, inverted dT, nucleic acid, nucleosides, Myristoyl, Lithocolic-oleyl,

Docosanyl, Lauroyl, Stearoyl, Palmitoyl, Oleoyl, Linoleoyl, other lipids, steroids, cholesterol, caffeine, vitamins, pigments, fluorescent substances, anticancer agent, toxin, enzymes, radioactive substance, biotin and the like. For such
5 alterations, see, for example, US Patents 5,660,985 and 5,756,703.

[0037]

The aptamers of the present invention can be chemically synthesized by disclosures herein and a method known per se in
10 the art. An aptamer binds to the target substance in a wide variety of binding modes, such as ionic bonds based on the negative charge of the phosphate group, hydrophobic bonds and hydrogen bonds based on ribose, and hydrogen bonds and stacking bonds based on nucleic acid bases. In particular, ionic bonds
15 based on the negative charge of the phosphate group, which are present in the same number as the number of constituent nucleotides, are strong, and bind to lysine and arginine being present on the surface of the positive charge of protein. For this reason, nucleic acid bases not involved in the direct
20 binding to the target substance can be substituted. In particular, because the region of stem structure has already formed base pairs and faces the inside of the double helical structure, nucleic acid bases are unlikely to bind directly to the target substance. Therefore, even when a base pair is
25 replaced with another base pair, the activity of the aptamer often does not decrease. In structures wherein no base pairs are formed, such as loop structures, provided that the nucleic acid base is not involved in the direct binding to the target molecule, base substitution is possible. Regarding
30 modifications of the 2'-position of ribose, the functional group at the 2'-position of ribose infrequently interacts directly with the target molecule, but in many cases, it is of no relevance, and can be substituted by another modified molecule. Hence, an aptamer, unless the functional group
35 involved in the direct binding to the target molecule is

substituted or deleted, often retains the activity thereof. It is also important that the overall steric structure does not change widely.

[0038]

5 An aptamer can be prepared by utilizing the SELEX method or an improved version thereof (for example, Ellington et al., (1990) Nature, 346, 818-822; Tuerk et al., (1990) Science, 249, 505-510). In the SELEX method, by increasing the number of rounds or using a competing substance, an aptamer exhibiting a
10 stronger binding force for the target substance is concentrated and selected. Hence, by adjusting the number of rounds of SELEX, and/or changing the competitive condition, aptamers with different binding forces, aptamers with different binding modes, and aptamers with the same binding force and binding mode but
15 different base sequences can be obtained in some cases. The SELEX method comprises a process of amplification by PCR; by causing a mutation by using manganese ions and the like in the process, it is possible to perform SELEX with higher diversity.
[0039]

20 The aptamers obtained by SELEX are nucleic acids that exhibit high affinity for the target substance, and this does not mean the binding thereof to the active site of the target substance. Therefore, the aptamers obtained by SELEX do not always act on a function of the target substance. MK has a
25 lysine-rich region in the tail region of each of the N'end and C end thereof, to which a nucleic acid is thought to bind nonspecifically. This tail portion is not considered to be important in the binding of heparin or chondroitin sulfate. It is not easy to prepare an aptamer that effectively inhibits an
30 activity of MK in such an environment. In fact, in the present invention, the cell migration inhibitory activities of 23 kinds of aptamers were examined, and only 4 kinds of aptamers retained not less than 50% of activity.

[0040]

35 The thus-selected aptamers with activity can be made to

have even higher performance by performing optimized SELEX. Optimized SELEX refers to a method in which SELEX is performed again after preparing a template wherein an aptamer with a certain fixed sequence is partially changed to include random
5 sequences or a template doped with about 10 to 30% of random sequences.

[0041]

An aptamer obtained by SELEX has a length of about 80 nucleotides, and this is difficult to prepare as a
10 pharmaceutical as it is. Hence, it is necessary to repeat try-and-error efforts to shorten the aptamer to a length of about 50 nucleotides or less enabling easy chemical synthesis.

Depending on the primer design for an aptamer obtained by SELEX, the ease of the subsequent minimization operation
15 changes. Unless the primer is designed successfully, subsequent development will be impossible even if an aptamer with activity is selected by SELEX.

[0042]

Aptamers are easily alterable because they permit
20 chemical synthesis. For aptamers, by predicting the secondary structure using the MFOLD program, or by predicting the steric structure by X-ray analysis or NMR analysis, it is possible to predict to some extent which nucleotide can be substituted or deleted, and where to insert a new nucleotide. An aptamer with
25 the predicted new sequence can easily be chemically synthesized, and it can be determined whether or not the aptamer retains the activity using an existing assay system.

[0043]

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

35 [0044]

Modifications, like sequences, afford a wide range of design or alterations.

[0045]

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

[0046]

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

[0047]

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

[0048]

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

[0049]

The present invention also provides a complex comprising

the aptamer of the present invention and a functional substance bound thereto. The bond between the aptamer and the functional substance in the complex of the present invention can be a covalent bond or a non-covalent bond. The complex of the present invention can be one wherein the aptamer of the present invention and one or more (e.g., 2 or 3) of functional substances of the same kind or different kinds are bound together. The functional substance is not particularly limited, as far as it newly confers a certain function to an aptamer of the present invention, or is capable of changing (e.g., improving) a certain characteristic which an aptamer of the present invention can possess. As examples of the functional substance, proteins, peptides, amino acids, lipids, sugars, monosaccharides, polynucleotides, and nucleotides can be mentioned. As examples of the functional substance, affinity substances (e.g., biotin, streptavidin, polynucleotides possessing affinity for target complementary sequence, antibodies, glutathione Sepharose, histidine), substances for labeling (e.g., fluorescent substances, luminescent substances, radioisotopes), enzymes (e.g., horseradish peroxidase, alkaline phosphatase), drug delivery vehicles (e.g., liposome, microspheres, peptides, polyethyleneglycols), drugs (e.g., those used in missile therapy such as calicheamycin and duocarmycin; nitrogen mustard analogues such as cyclophosphamide, melphalan, ifosfamide or trofosfamide; ethylenimines such as thiotepa; nitrosoureas such as carmustine; reast agents such as temozolomide or dacarbazine; folate-like metabolic antagonists such as methotrexate or raltitrexed; purine analogues such as thioguanine, cladribine or fludarabine; pyrimidine analogues such as fluorouracil, tegafur or gemcitabine; vinca alkaloids such as vinblastine, vincristine or vinorelbine and analogues thereof; podophyllotoxin derivatives such as etoposide, taxans, docetaxel or paclitaxel; anthracyclines such as doxorubicin, epirubicin, idarubicin and mitoxantrone and analogues thereof;

other cytotoxic antibiotics such as bleomycin and mitomycin;
platinum compounds such as cisplatin, carboplatin and
oxaliplatin; pentostatin, miltefosine, estramustine, topotecan,
irinotecan and bicalutamide), and toxins (e.g., ricin toxin,
5 liatoxin and Vero toxin) can be mentioned. These functional
molecules are finally removed in some cases. Furthermore, the
molecules may be peptides that can be recognized and cleaved by
enzymes such as thrombin, matrix metal protease (MMP), and
Factor X, polynucleotides that can be cleaved by nucleases or
10 restriction endonuclease.

[0050]

The aptamer or the complex of the present invention can
be used as, for example, a pharmaceutical or a reagent (e.g.,
diagnostic reagents, test reagents (including experimental
15 reagents)). For example, the aptamers or the complex of the
present invention can be used as inhibitors of cell migration,
promoters of regulatory T cell proliferation, promoters of
regulatory T cell suppressive function, apoptosis inhibition
suppressants, cell proliferation inhibitors, cell
20 differentiation inhibitors, drug delivery agents, probes for in
vivo imaging, probes for measuring blood concentrations of MK,
probes for tissue staining, probes for ELISA, and ligands for
MK separation and purification.

[0051]

25 The aptamers or the complex of the present invention can
also be used in the prevention or treatment of various diseases
such as autoimmune diseases (e.g., multiple sclerosis, systemic
lupus erythematosus (SLE), Sjögren's disease, polymyositis (PM),
dermatomyositis (DM), rheumatic arthritis (rheumatoid arthritis
30 (RA), osteoarthritis (OA)), inflammatory enteritis (Crohn's
disease and the like), progressive systemic sclerosis (PSS),
periarteritis nodosa (PN), thyroid diseases (Basedow's disease
and the like), Guillain-Barré syndrome, primary biliary
cirrhosis (PBC), idiopathic thrombocytopenic purpura,
35 autoimmune hemolytic anemia, myasthenia gravis (MG),

amyotrophic lateral sclerosis (ALS), type I diabetes, psoriasis, asthma, neutrophil functional abnormalities), cancers (e.g., esophageal cancer, thyroid cancer, urinary bladder cancer, colorectal cancer, gastric cancer, pancreatic cancer, chest
5 cancer, liver cancer, lung cancer, breast cancer, neuroblastoma, neuroglastoma, glioblastoma, uterine cancer, ovarian cancer, Wilms' tumor, prostatic cancer), postoperative adhesion, endometriosis, rejections in transplantation, allergies, restenosis following vascular reconstruction surgery, cardiac
10 coronary arterial vascular obstructive disease, cerebral vascular obstructive disease, renal vascular obstructive disease, peripheral vascular obstructive disease, arteriosclerosis, and cerebral infarction. In particular, the aptamers of the present invention inhibit the cell migration
15 activity of MK, and are therefore useful in preventing or treating multiple sclerosis, postoperative adhesion, endometriosis, rheumatoid arthritis, and vascular stenosis.
[0052]

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

polyvinylpyrrolidone, and aluminum stearate; dispersing agents such as surfactants; diluents such as water, physiological saline, and orange juice; base waxes such as cacao butter, polyethylene glycol, and kerosene; and the like can be mentioned, but these are not limitative.

[0053]

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

[0054]

The pharmaceutical of the present invention can be coated by a method known per se for the purpose of taste masking, enteric dissolution, sustained release and the like as required. As examples of coating agents used for the coating, hydroxypropylmethylcellulose, ethylcellulose, hydroxymethylcellulose, hydroxypropylcellulose, polyoxyethylene glycol, Tween 80, Pluronic F68, cellulose acetate phthalate, hydroxypropylmethylcellulose phthalate, hydroxymethylcellulose acetate succinate, Eudragit (manufactured by Rohm, Germany, methacrylic acid/acrylic acid copolymer), pigments (e.g., red iron oxide, titanium dioxide and the like) and the like are used. The pharmaceutical may be a rapid-release preparation or sustained-release preparation. As examples of sustained-release base materials, liposome, atherocollagen, gelatin, hydroxyapatite, PLGA and the like can be mentioned.

[0055]

As preparations suitable for parenteral administration (for example, intravenous administration, subcutaneous administration, intramuscular administration, topical

administration, intraperitoneal administration, intranasal administration, pulmonary administration and the like), aqueous and non-aqueous isotonic sterile injectable liquids are available, which may comprise an antioxidant, a buffer solution, 5 a bacteriostatic agent, an isotonizing agent and the like. Aqueous and non-aqueous sterile suspensions can also be mentioned, which may comprise a suspending agent, a solubilizer, a thickener, a stabilizer, an antiseptic and the like. The preparation can be included in a container such as an ampoule 10 or a vial in a unit dosage volume or in several divided doses. An active ingredient and a pharmaceutically acceptable carrier can also be freeze-dried and stored in a state that may be dissolved or suspended in an appropriate sterile vehicle just before use. Furthermore, in addition to injectable liquids, 15 inhalants and ointments are also possible. In the case of an inhalant, an active ingredient in a freeze-dried state is micronized and administered by inhalation using an appropriate inhalation device. An inhalant can be formulated as appropriate with a conventionally used surfactant, oil, 20 seasoning, cyclodextrin or derivative thereof and the like as required.

Here, as examples of the surfactant, oleic acid, lecithin, diethyleneglycol dioleate, tetrahydroflurfuryl oleate, ethyl oleate, isopropyl myristate, glyceryl trioleate, glyceryl 25 monolaurate, glyceryl monoleate, glyceryl monostearate, glyceryl monolysinoate, cetyl alcohol, stearyl alcohol, polyethyleneglycol 400, cetylpyridinium chloride, sorbitan trioleate (trade name Span 85), sorbitan monoleate (trade name Span 80), sorbitan monolaurate (trade name Span 20), 30 polyoxyethylene hardened castor oil (trade name HCO-60), polyoxyethylene (20) sorbitan monolaurate (trade name Tween 20), polyoxyethylene (20) sorbitan monoleate (trade name Tween 80), lecithin of natural resource origin (trade name EPICLON), oleylpolyoxyethylene (2) ether (trade name Brij 92), stearyl 35 polyoxyethylene (2) ether (trade name Brij 72), lauryl

polyoxyethylene (4) ether (trade name Brij 30),
oleylpolyoxyethylene (2) ether (trade name Genapol 0-020),
block copolymer of oxyethylene and oxypropylene (trade name
Synperonic) and the like can be mentioned. As examples of the
5 oil, corn oil, olive oil, cottonseed oil, sunflower oil and the
like can be mentioned. In the case of an ointment, an
appropriate pharmaceutically acceptable base (yellow petrolatum,
white petrolatum, paraffin, plastibase, silicone, white
ointment, beeswax, lard, vegetable oils, hydrophilic ointment,
10 hydrophilic petrolatum, purified lanolin, hydrolyzed lanolin,
water-absorbing ointment, hydrophilic plastibase, macrogol
ointment and the like) is blended with an active ingredient and
used as a preparation.

[0056]

15 An inhalant can be produced according to a conventional
method. Specifically, an inhalant can be produced by powdering
or liquefying the above-described aptamer or complex of the
present invention, blending it in an inhalation propellant
and/or carrier, and filling it in an appropriate inhalation
20 vessel. When the above-described aptamer or complex of the
present invention is a powder, an ordinary mechanical powder
inhalator can be used; in the case of a liquid, an inhalator
such as a nebulizer can be used. Here, as the propellant,
conventionally known one can be widely used;
25 chlorofluorocarbon-series compounds such as chlorofluorocarbon-
11, chlorofluorocarbon-12, chlorofluorocarbon-21,
chlorofluorocarbon-22, chlorofluorocarbon-113,
chlorofluorocarbon-114, chlorofluorocarbon-123,
chlorofluorocarbon-142c, chlorofluorocarbon-134a,
30 chlorofluorocarbon-227, chlorofluorocarbon-C318, and 1,1,1,2-
tetrafluoroethane, hydrocarbons such as propane, isobutane, and
n-butane, ethers such as diethyl ether, compressed gases such
as gaseous nitrogen and gaseous carbon dioxide and the like can
be mentioned.

35 [0057]

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

10 [0058]

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

[0059]

The aptamer and/or the complex of the present invention can be immobilized onto a solid phase carrier by a method known

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

[0060]

The present invention also provides a method of purifying
15 and concentrating MK. The method of purification and concentration of the present invention can comprise adsorbing MK to the solid phase carrier of the present invention, and eluting the adsorbed MK with an eluent. Adsorption of MK to the solid phase carrier of the present invention can be
20 achieved by a method known per se. For example, an MK-containing sample (e.g., bacterial or cell culture or culture supernatant, blood) is introduced into the solid phase carrier of the present invention or a composition containing the same. MK elution can be achieved using an eluent such as a neutral
25 solution. The neutral eluent is not particularly limited, and can have a pH of, for example, about 6 to about 9, preferably about 6.5 to about 8.5, and more preferably about 7 to about 8. The neutral solution can also be one comprising, for example, a potassium salt (e.g., NaCl, KCl), a magnesium salt (e.g.,
30 MgCl₂), a surfactant (e.g., Tween 20, Triton, NP40), or glycerin. The method of purification and concentration of the present invention can further comprise washing the solid phase carrier using a washing solution after MK adsorption. As examples of the washing solution, those containing urea, a
35 chelating agent (e.g., EDTA), Tris, an acid, or an alkali, and

the like can be mentioned. The method of purification and concentration of the present invention can still further comprise heating the solid phase carrier. This step enables the regeneration and sterilization of the solid phase carrier.

5 [0061]

The present invention also provides a method of detecting and quantifying MK. The method of detection and quantitation of the present invention can comprise measuring MK by utilizing the aptamer of the present invention (e.g., by the use of the
10 complex and solid phase carrier of the present invention). The method of detecting and quantifying MK can be performed in the same manner as an immunological method, except that the aptamer of the present invention is used in place of an antibody.

Therefore, by using the aptamer of the present invention in
15 place of an antibody, in the same manner as such methods as enzymeimmunoassay (EIA) (e.g., direct competitive ELISA, indirect competitive ELISA, sandwich ELISA), radioimmunoassay (RIA), fluorescent immunoassay (FIA), Western blot technique (e.g., use as a substitute for secondary antibody in Western
20 blot technique), immunohistochemical staining method, and cell sorting method, detection and quantitation can be performed. These methods can be useful in, for example, measuring MK contents in a living organism or biological sample, and diagnosing MK-related diseases.

25 [0062]

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

30 [0063]

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

[Example 1]

35 [0064]

Preparation of nucleic acids that bind specifically to midkine
1

Nucleic acids that bind specifically to midkine were prepared using the SELEX method. SELEX was performed with
5 improvements of the method of Ellington et al. (Ellington and Szostak, Nature 346, 818-822, 1990) and the method of Tuerk et al. (Tuerk and Gold, Science 249, 505-510, 1990). As the target substance, human midkine was prepared using yeast with reference to a method of Murasugi et al. (Murasugi and Tohma-
10 Aiba, Protein Expression and Purification 27, 244-252, 2003). Hereinafter, unless otherwise specified, midkine means human midkine. Midkine was immobilized on an agarose resin (NHS-activated Sepharose, manufactured by Amersham Bioscience) by aminocoupling. The aminocoupling was performed as directed in
15 the specifications of Amersham Bioscience. The amount immobilized was confirmed by examining the midkine solution just before immobilization and the supernatant just after immobilization by SDS-PAGE. As a result of the SDS-PAGE, no band of midkine was detected in the supernatant; it was
20 confirmed that nearly all of the midkine used had been coupled. This means that about 175 µg of midkine was immobilized to about 70 µL of the resin.

The RNA used in the first round (40N-RNA) was obtained by transcribing a chemically synthesized DNA using the
25 DuraScribe™ T7 Transcription Kit (manufactured by Epicentre). The RNA obtained by this method has the 2'-position of the ribose of the pyrimidine nucleotide fluoro-substituted. The DNA 94 nucleotides long shown below, having a primer sequence at each end of a 40-nucleotide random sequence was used as DNA
30 template. The DNA template and the primers were prepared by chemical synthesis (manufactured by Operon).

[0065]

DNA template: 5'-tcctcattcctgtcctcta-40N-ttcctcttctcctctccc-3'
(SEQ ID NO:71)

35 Primer Fwd: 5'-taatacgactcactatagggagaggagaagaggaa-3' (SEQ ID

NO:72)

Primer Rev: 5'-tcctcattcctgtcctcta-3' (SEQ ID NO:73)

N represents any one of A, G, C and T. The primer Fwd comprises a promoter sequence of T7 RNA polymerase. The
5 variation of the RNA pool used in the first round was theoretically 10^{14} .

[0066]

The RNA pool was added to the midkine-immobilized resin, and allowed to stand at room temperature for 30 minutes. After
10 30 minutes, to remove the RNA not bound to midkine, the resin was washed with solution A. Here, the solution A was a mixed solution of 145 mM sodium chloride, 5.4 mM potassium chloride, 1.8 mM calcium chloride, 0.8 mM magnesium chloride, and 20 mM Tris (pH7.6). The midkine-bound RNA was recovered via heating
15 at 95°C for 10 minutes with the addition of an eluent. As the eluent, a mixed solution of 7 M urea, 3 mM EDTA, and 100 mM TRIS, adjusted to pH 6.6, was used. The recovered RNA was amplified by RT-PCR and transcribed using the DuraScribe™ T7 Transcription Kit, and this was used as the pool for the next
20 round. With this procedure taken as 1 round, the same operation was performed in 7 rounds. After completion of SELEX, the PCR product was cloned into pGEM-T Easy vector (manufactured by Promega), and the Escherichia coli strain DH5α (manufactured by Toyobo) was transformed therewith. After the
25 plasmid was extracted from a single colony, the base sequences of 48 clones were determined using a DNA sequencer (ABI PRISM 3100, manufactured by ABI).

After SELEX was performed in 7 rounds, the sequences were examined; the sequences exhibited convergence. Twenty copies
30 of the sequence shown by SEQ ID NO:1 existed, and one copy of the 2-base substituted form existed. Two copies of the sequence shown by SEQ ID NO:2 existed. One copy of each of the sequences shown by SEQ ID NO:3 to 5 existed. The secondary structures of the RNAs shown by SEQ ID NO:1 to 5 were estimated
35 using the MFOLD program (M. Zuker, Nucleic Acids Res. 31 (13),

3406-3415, 2003). As a result, internal loop-stem-hairpin loop structures morphologically similar to the RNAs shown by SEQ ID NO:2, 3, and 4 were seen (FIG. 1 to 5). All hairpin loops were made up of eight nucleotides; 2 and 3 were 1-base substituted forms compared with SEQ ID NO:4. Regarding the stems, SEQ ID NO:2 was configured with two base pairs, and SEQ ID NO:3 and 4 were configured with three base pairs.

[0067]

Each nucleotide sequence is shown in the following. The parentheses in each nucleotide show modifications at the 2'-position and F is fluorine atom (hereinafter the same).

SEQ ID NO:1:

gggagaggagaagaggaaau(F) agu(F) u(F) aagggg(F) gaau(F) u(F) u(F) gc(F) g
aaagc(F) u(F) au(F) u(F) u(F) u(F) agu(F) c(F) gc(F) agu(F) agaggac(F) agg
15 aau(F) gagga

SEQ ID NO:2:

gggagaggagaagaggaaggac(F) u(F) aagu(F) aagagaac(F) ac(F) c(F) ggaau(F)
) gaagggac(F) u(F) u(F) ac(F) gu(F) gu(F) agaggac(F) aggaau(F) gagga

SEQ ID NO:3:

20 gggagaggagaagaggaaagc(F) c(F) u(F) u(F) c(F) u(F) ac(F) c(F) gaaagu(F) g
ggaaagc(F) ac(F) ac(F) au(F) aaau(F) c(F) u(F) ggu(F) agaggac(F) aggaau(F)
F) gaga

SEQ ID NO:4:

gggagaggagaagaggaac(F) gu(F) gc(F) u(F) c(F) u(F) gu(F) ac(F) gaggagu(F)
25) agc(F) c(F) ggaaagaaggc(F) ggu(F) gu(F) gu(F) agaggac(F) aggaau(F) gag
a

SEQ ID NO:5:

gggagaggagaagaggaagu(F) gu(F) gc(F) ac(F) aggggu(F) u(F) ggu(F) gu(F) c
(F) ggggu(F) gc(F) au(F) ac(F) agu(F) au(F) aagau(F) agaggac(F) aggaau(F)
30 gaga

[0068]

sequence of hairpin loop

SEQ ID NO:2 -ggaaugaa-

SEQ ID NO:3 -ggaaagca-

35 SEQ ID NO:4 -ggaaagaa-

[Example 2]

[0069]

Preparation of nucleic acids that bind specifically to midkine
2

5 To prepare aptamers that bind to midkine but do not bind
to pleiotrophin, a midkine family protein, SELEX including pre-
subtraction using pleiotrophin was performed. First, as with
midkine, pleiotrophin was immobilized to agarose resin by
aminocoupling. Next, the RNA pool was added to the
10 pleiotrophin-bound resin, and allowed to stand at room
temperature for 30 minutes. Thereafter, only the supernatant
was recovered. Theoretically, this supernatant should not
contain an RNA that binds to pleiotrophin. This supernatant
was added to the midkine-bound resin, and SELEX was performed
15 in the same manner as Example 1. The pleiotrophin used had
been expressed in yeast by the method of Murasugi et al.
(Murasugi, Kido, Kumai, and Asami, Biosci. Biotech. Biochem. 67
(10), 2288-2290, 2003). The DNA template and primers used were
the same as those used in Example 1.

20 After completion of 7 rounds, the sequences of 48 clones
were checked; convergence was observed in the sequences. Among
them, ten copies of the same sequence as SEQ ID NO:3 obtained
in Example 1 existed, and one copy of the 1-base substituted
form existed. Six copies of the same sequence as SEQ ID NO:2
25 existed, and two copies of the 1-base substituted form existed.
Furthermore, one copy of the same sequence as SEQ ID NO:5
existed.

[Example 3]

[0070]

30 Preparation of nucleic acids that bind specifically to midkine
3

When midkine is immobilized by aminocoupling, important
portions may collapse depending on the site of aminocoupling.
Hence, filter binding SELEX using a nitrocellulose membrane,
35 which does not involve immobilization to a carrier, was

performed. This is intended to separate nucleic acids that bind to the target protein and nucleic acids that do not bind, on the basis of the fact that proteins are likely to bind to nitrocellulose membranes, whereas nucleic acids are unlikely to bind. An RNA pool and midkine were mixed, allowed to stand for 30 minutes at room temperature, and then the mixture was filtered using a nitrocellulose membrane. After the nitrocellulose membrane was thoroughly washed with solution A, the nitrocellulose membrane was immersed in eluent B and heated at 90°C for 5 minutes. Subsequently, in the same manner as Example 1, the RNA was recovered by ethanol precipitation, amplified by RT-PCR, and transcribed to the RNA pool for the next round. The DNA template and primers used were the same as those used in Example 1. The eluent B is a mixed liquid of 50% phenol and 6 M urea.

After completion of six rounds, the sequences of 48 clones were checked; no sufficient convergence was obtained. Hence, SELEX was performed in three more rounds; after completion of the nine rounds, the sequences of the 48 clones were checked; sufficient convergence was observed. Among the sequences, 21 copies of the same sequence as SEQ ID NO:2 existed, and four copies of the 1-base substituted form existed. Ten copies of the same sequence as SEQ ID NO:4 existed. Three new sequences were discovered, none of which exhibited convergence.

[Example 4]

[0071]

Evaluation of binding activities by surface plasmon resonance method

The binding activities of the RNAs shown by SEQ ID NO:1 to 5 for midkine were examined by a surface plasmon resonance method. The measurements were performed using BIAcore2000, manufactured by BIAcore. The sensor chip used was the SA chip, which had streptavidin immobilized thereon. Bound thereto was about 1000 RU of a 16-nucleotide Poly dT with biotin bound to

the 5' end thereof. The RNA being the ligand had a 16-nucleotide Poly A added to the 3' end thereof, and immobilized to the SA chip via a bond between dT and A. The amount immobilized was about 1000 RU. 70 μ L of midkine for analyte, prepared at 0.5 μ M, was injected. The running buffer used for BIAcore was solution A. As a result of the measurements, it was found that all of the RNAs shown by SEQ ID NO:1 to 5 bound to midkine (FIG. 6). For negative control, a similar measurement was performed with the 40N-RNA, which comprised a 40-nucleotide random sequence, immobilized. As a result, it was found that the 40N-RNA also possessed affinity for midkine. The degree was high at similar levels to the affinities of the RNAs shown by SEQ ID NO:1 to 5. Because midkine contains large amounts of basic amino acids such as lysine, it is expected to bind nonspecifically to negatively charged nucleic acids.

Hence, a measurement was performed using as the running buffer for BIAcore a buffer with a high salt concentration (solution B) prepared by changing the sodium chloride concentration of solution A to 500 mM. It was anticipated that by using the buffer with a high salt concentration, ionic bonding nonspecific adsorption could be reduced. As a result of the measurement, it was found that the 40N-RNA hardly bound to midkine. Meanwhile, the RNAs shown by SEQ ID NO:2 to 5 bound to midkine at higher degrees than with the 40N-RNA (FIG. 7). The fact of binding at the high salt concentration means that the bond is likely to be a hydrophobic bond. This suggests that these RNAs may not be bound nonspecifically to the lysine portion, but specifically recognize midkine.

Next, an experiment was performed in which midkine was immobilized to the CM4 sensor chip by aminocoupling, and the RNA shown by SEQ ID NO:4 or 5, as analyte, was injected, whereby the affinity of RNA and midkine was checked. Midkine immobilization was achieved using N-hydroxysuccinimide (NHS, 11 mg/L) and N-ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDC, 75 mg/L) per the specifications of BIAcore.

Midkine was diluted with HBS-EP buffer (manufactured by BIAcore) and used at a concentration of 20 µg/mL. For blocking, 1 M ethanolamine hydrochloride (pH 8.5) was used. MK (1?59, MK?N, manufactured by Peptide Institute, Inc.) was immobilized to the flow cell 2 of one sensor chip, MK (60?121, MK?C, manufactured by Peptide Institute, Inc.) was immobilized to the flow cell 3, and full-length midkine (MK?NC) was immobilized to the flow cell 4. The flow cell 1 was used as a cell for control. By immobilizing 3 kinds of midkine and midkine fragment to one sensor chip as described above, the affinities for 3 kinds of ligands can be measured at one time. As a result of the measurement, it was found that the RNA shown by SEQ ID NO:4 bound to full-length midkine (hereinafter, written MK-NC) and the C-domain of midkine (hereinafter, written MK-C), but did not bind to the N-domain of midkine (hereinafter, written MK-N) (Table 1). Meanwhile, the RNA shown by SEQ ID NO:5 bound to all of MK-NC, MK-N, and MK-C, but the affinity was higher for MK-N than for MK-C.

[0072]

20 [Table 1]

Affinity of midkine and various analytes

	Midkine		
	Full-length	MK-N	MK-C
SEQ ID NO:4	+++	-	++
SEQ ID NO:5	+++	++	+
Heparin	+++	+	+++
Chondroitin sulfate E	+++	+	+++
Chondroitin sulfate C	+	-	+
tRNA	+++	-	+++

Measured by the surface plasmon resonance method. Midkine was immobilized to the CM4 sensor chip, and various analytes were injected. Affinity is higher in the order of +++, ++, + and -.

25

[0073]

Similar experiments were performed using as analyte, in

place of RNA, heparin (Heparin, Sodium Salt, Porcine Intestinal Mucosa, Low Molecular Weight, Mw: 5000, manufactured by Calbiochem), chondroitin sulfate E (From Squid cartilage, manufactured by Seikagaku Corporation), chondroitin sulfate C
5 (From Shark cartilage, Mw: 40,000-80,000, manufactured by Seikagaku Corporation), or tRNA (manufactured by Sigma). As a result, it was found that all these analytes had low affinity for MK-N and bound mainly to MK-C (Table 1).

From above, it was found that the RNA shown by SEQ ID
10 NO:4, like heparin and the like, bound to the C domain of midkine. Meanwhile, it was found that the RNA shown by SEQ ID NO:5 had low affinity for the C domain and bound more strongly to the N domain. This shows that the RNAs shown by SEQ ID NO:4
15 and 5 bind to different sites of midkine. Midkine is known to have in the C domain thereof an active site being a heparin-binding site (Muramatsu H et al., Biochem Biophys Res Commun. 1994 Sep 15;203(2):1131-9., 106.; Iwasaki W et al., EMBO J. 1997 Dec 1;16(23):6936-46.).

[0074]

20 It was determined whether or not the RNA shown by SEQ ID NO:5 possessed a binding activity for the midkine family protein pleiotrophin by the surface plasmon resonance method as described above. The RNA was immobilized to the SA sensor chip, and 0.5 μ M pleiotrophin was injected. To reduce nonspecific
25 adsorption, 0.4 mg/mL tRNA was added to the pleiotrophin solution. As a result of the measurement, it was found that the RNA shown by SEQ ID NO:5 possessed a binding activity for pleiotrophin, but the degree was lower than that for midkine. Using the 40N-RNA as the ligand, a similar measurement was
30 performed. Both midkine and pleiotrophin bound to the 40N-RNA, but the degree was lower than that for the RNA shown by SEQ ID NO:5. The 40N-RNA exhibited higher affinity for midkine than for pleiotrophin. From above, it was found that pleiotrophin, like midkine, possessed a propensity to bind to nucleic acids.
35 It was also found that the RNA shown by SEQ ID NO:5 possessed

higher affinity for midkine than for pleiotrophin.

[0075]

Next, it was determined whether or not the RNAs shown by SEQ ID NO:4 and 5 possessed affinity for other proteins. As the proteins, human IgG1 (manufactured by Calbiochem) and human albumin (manufactured by Sigma) were used. Each RNA was immobilized using the SA sensor chip as described above, and each protein as analyte was injected. As a result, human IgG1 and human albumin did not bind to any of the RNAs shown by SEQ ID NO:4 and 5 at all. From above, it was found that the RNAs shown by SEQ ID NO:4 and 5 did not bind to human albumin and human IgG, which are present in large amounts in the blood.

[0076]

The binding activities of the RNAs shown by SEQ ID NO:2 to 7, 31, 32, 36, 40, 40-1 and 40-2 with MK were measured. As described above, the measurement was performed with MK immobilized to the CM4 sensor chip. As a result, it was found that all of these RNAs possessed affinity for MK.

[Example 5]

[0077]

Evaluation of RNA aptamers by cell migration inhibition experiment

Midkine is known to possess osteoblast progenitor cell infiltrating action (Qi et al., J. Biol. Chem. 276 (19), 15868-15875, 2001). Hence, it was examined whether or not the prepared RNA aptamers inhibited the cell migration activity of midkine using UMR106 cells of a rat osteoblast progenitor cell line (ATCC No. CRL1661). 30 μ L of 1.5 μ M midkine was applied to the outer surface of the membrane of Chemotaxicell (membrane pore diameter 8 μ m, manufactured by Kurabo) to immobilize the midkine to the outer surface of the membrane. The midkine-immobilized Chemotaxicell was placed on a 24-well culture plate containing 500 μ L of a medium (supplemented with 0.3% bovine serum albumin, Dulbecco's Modified Eagle's medium) supplemented with each RNA aptamer added thereto at 100 nM. 200 μ L of

UMR106 cells were placed in the inner layer of the Chemotaxicell chamber at a density of 1×10^6 cells/mL, and cultured at 37°C for 4 hours. The cells remaining in the inner layer of the Chemotaxicell chamber were removed, and the cells that had infiltrated and adhered to the midkine-applied surface were fixed with methanol. The Chemotaxicell chamber was immersed in a 1% aqueous solution of Crystal Violet for 30 minutes to stain the cells. After the Chemotaxicell chamber was washed with distilled water and dried, the pigment was extracted with a mixed solution of 200 μ L of 1% SDS and 1% triton X100. 150 μ L of the extract was transferred to a 96-well microplate, and its absorbance at 590 nm was determined.

As a result of the measurement, it was found that the RNAs shown by SEQ ID NO:1, 2, 4, and 5 possessed a remarkable cell migration inhibitory activity. The results are shown in Table 2. The aptamer shown by SEQ ID NO:5 exhibited the highest inhibitory activity, the mean for 14 measurements being 76%. The 40N-RNA, used as the negative control, exhibited almost no inhibitory activity.

[0078]

[Table 2]

Cell migration inhibitory activities of prepared aptamers against midkine and pleiotrophin

SEQ ID NO	Midkine		Pleiotrophin	
	Inhibitory activity %	Number of measurements	Inhibitory activity %	Number of measurements
1	36	4	0	2
2	45	4	-	-
4	63	6	8	2
5	76	14	17	6
40N-RNA	8	6	28	2

RNA concentration: 100 nM

Here, inhibitory activity % is a value obtained by subtracting the number of cells moving with the addition of the aptamer from the number of cells moving without the addition of the aptamer (absorbance of stained cell extract) taken as 100. In

the table, each % value is the mean for the number of measurements indicated.

[0079]

5 Next, it was measured whether or not the aptamers shown by SEQ ID NO:4 and 5 possessed a cell migration inhibitory activity against pleiotrophin. The experiment was performed as described above, except that pleiotrophin was used in place of midkine. As a result of the experiment, it was found that
10 these aptamers did not exhibit a remarkable inhibitory activity against pleiotrophin (Table 2).

[0080]

Next, it was measured whether or not heparin, chondroitin sulfate E, chondroitin sulfate C inhibit the cell migration
15 activities of midkine and pleiotrophin. The experiment was performed as described above, except that the aptamers were replaced with heparin, chondroitin sulfate E or chondroitin sulfate C. The supply of heparin used was a product manufactured by Nacalai Tesque. The supplies of chondroitin
20 sulfate E and C used were the same as those used in Example 4. The concentrations of heparin and chondroitin sulfate E were 0.1, 1, 10, and 100 µg/mL. As a result of the experiment, heparin at 0.1 µg/mL inhibited the cell migration activities of midkine and pleiotrophin. At a concentration of 1 µg/mL,
25 heparin inhibited the cell migration activities of midkine and pleiotrophin by not less than 80%. Meanwhile, chondroitin sulfate E at a concentration of 10 µg/mL inhibited midkine by 49%, and pleiotrophin by 69%. Assuming the molecular weight of chondroitin sulfate C to be 40,000, the experiment was
30 performed at 500 nM (20 µg/mL). As a result, when the inhibitory activity of the aptamer shown by SEQ ID NO:4 (500 nM) was taken as 100, the inhibitory activity of chondroitin sulfate C was 44.

[0081]

35 From above, it was found that the aptamers shown by SEQ

ID NO:1, 2, 4, and 5 bound specifically to midkine to inhibit the cell migration activity thereof. The 40N-RNA nonspecifically adsorbed to midkine electrostatically, but did not inhibit cell migration activity. This shows that the RNAs that had been obtained by SELEX are not attributable to nonspecific adsorption, but bind to an important site associated with the cell migration activity. Heparin and chondroitin sulfate E equivalently inhibited the cell migration activity without distinguishing between midkine and pleiotrophin. Meanwhile, the aptamers shown by SEQ ID NO:4 and 5 inhibited only the activity of midkine. Since midkine and pleiotrophin have a homology of 50%, and also since the heparin-binding site is conserved at a high level, the high specificities of the aptamers are understandable.

[Example 6]

[0082]

Miniaturization and stabilization of the aptamer shown by SEQ ID NO:4

The aptamer shown by SEQ ID NO:4 is 77 nucleotides long, having the 2' position of the ribose of the pyrimidine nucleotide thereof fluoro-substituted. To enable the chemical synthesis, to reduce the toxicity, and to improve the stability in the blood, miniaturization and stabilization of this aptamer were performed. The operations of miniaturization and stabilization were performed on the basis of the secondary structure estimated by the MFOLD program, and the activity was evaluated by a cell migration inhibition experiment. In the cell migration inhibition experiment, the RNA concentration was 100 nM or 500 nM. Since some errors occur in experimental results depending on cell condition, a previously assayed sample was included as a positive control in each measurement. The inhibitory activities obtained when the RNA concentration was 500 nM are shown in Table 3 (Tables 3-1 and 3-2). The inhibitory activities are expressed as relative values with the activity of the aptamer shown by SEQ ID NO:4 taken as 100, so

as to clarify the activity differences among the altered forms. The inhibitory activity % of the aptamer shown by SEQ ID NO:4 (a value obtained by subtracting the number of cells moving with the addition of the aptamer from 100, which is the number of cells moving without the addition of the aptamer) was 73% when the RNA concentration was 500 nM. This is the mean for 4 measurements. The mean for 6 measurements of the inhibitory activity % was 63% when the RNA concentration was 100 nM.

[0083]

10 [Table 3-1]

Cell migration inhibitory activities of altered forms of the RNA shown by SEQ ID NO:4 against midkine

SEQ ID NO	Activity	Number of measurements	Length (nt)
4	100	2	77
	57 (mouse)	2	
6	110	2	67
7	91	2	64
8	100	2	69
9	57	2	66
10	81	2	73
11	100	2	77
12	100	2	58
13	100	2	50
14	100	2	54
15	75	2	56
16	61	2	57
17	68	2	46
18	88	2	37
19	94	2	44
20	97	2	42
20-1	109	2	42
20-2	84	2	42
20-3	60	2	42
20-4	60	2	42
20-5	88	2	42
20-6	69	2	42

20-7	88	2	42
20-8	99	2	42
20-9	130	2	42
20-10	86	2	42
20-11	76	2	42
20-12	53	2	42
20-13	89	2	42

[0084]

[Table 3-2]

SEQ ID NO	Activity	Number of measurements	Length (nt)
21	0	2	44
22	70	6	33
23	66	2	38
24	65	2	38
25	81	2	41
26	18	2	41
27	78	2	41
28	71	2	31
29	74	2	31
Cond-C	44	2	

The RNA concentration was 500 nM. The activities are expressed as relative values with the activity of the RNA shown by SEQ ID NO:4 taken as 100. The inhibitory activity % of the RNA shown by SEQ ID NO:4 was 73%. This value is the mean for 4 measurements. (mouse) indicates a value relative to mouse midkine. Cond-C indicates chondroitin sulfate C.

[0085]

10 The altered parts in the altered forms (SEQ ID NOs:6-29) are explained below.

SEQ ID NO:6: 10 nucleotides were deleted from single stranded part at the 3' end side of RNA shown by SEQ ID NO:4.

15 gggagaggagaagaggaac(F) gu(F) gc(F) u(F) c(F) u(F) gu(F) ac(F) gaggagu(F)
) agc(F) c(F) ggaaagaaggc(F) ggu(F) gu(F) gu(F) agaggac(F) a

SEQ ID NO:7: 14 nucleotides were deleted from single stranded part at the 5' end side of RNA shown by SEQ ID NO:4, and one G

was added for transcription.

gggaac(F)gu(F)gc(F)u(F)c(F)u(F)gu(F)ac(F)gaggagu(F)agc(F)c(F)gg
aaagaaggc(F)ggu(F)gu(F)gu(F)agaggac(F)aggaau(F)gagga

SEQ ID NO:8: 4 base pairs were deleted from the stem at the end
5 side of RNA shown by SEQ ID NO:4.

gggagaggagaagaggaac(F)gc(F)u(F)gu(F)ac(F)gaggagu(F)agc(F)c(F)gg
aaagaaggc(F)ggu(F)gu(F)gu(F)agc(F)aggaau(F)gagga

SEQ ID NO:9: 8 nucleotides from internal loop and CGG on the
opposite side thereof were deleted from RNA shown by SEQ ID
10 NO:4.

gggagaggagaagaggaac(F)gu(F)gc(F)u(F)c(F)u(F)gu(F)ac(F)gc(F)c(F)
ggaaagaaggu(F)gu(F)gu(F)agaggac(F)aggaau(F)gagga

SEQ ID NO:10: the loop portion was replaced with GAAA tetra
loop in RNA shown by SEQ ID NO:4.

15 gggagaggagaagaggaac(F)gu(F)gc(F)u(F)c(F)u(F)gu(F)ac(F)gaggagu(F)
)agc(F)c(F)gaaaggc(F)ggu(F)gu(F)gu(F)agaggac(F)aggaau(F)gagga
[0086]

SEQ ID NO:11: 3 G-U base pairs were replaced with G-C base
pairs in the stem at the end side of RNA shown by SEQ ID NO:4.

20 gggagaggagaagaggaac(F)gu(F)gc(F)u(F)c(F)u(F)gc(F)ac(F)gaggagu(F)
)agc(F)c(F)ggaaagaaggc(F)ggc(F)gu(F)gc(F)agaggac(F)aggaau(F)gag
ga

SEQ ID NO:12: three G-U base pairs were replaced with G-C base
pairs in the stem at the end side and 11 nucleotides were
25 deleted from single stranded part at the 3' end side of RNA
shown by SEQ ID NO:8.

gggagaggagaagaggaac(F)gc(F)u(F)gc(F)ac(F)gaggagu(F)agc(F)c(F)gg
aaagaaggc(F)ggc(F)gu(F)gc(F)agc(F)

SEQ ID NO:13: 11 nucleotides were deleted from single stranded
30 part at the 5' end side of RNA shown by SEQ ID NO:12, and GGG
was added thereto for transcription.

gggagaggaac(F)gc(F)u(F)gc(F)ac(F)gaggagu(F)agc(F)c(F)ggaaagaagg
c(F)ggc(F)gu(F)gc(F)agc(F)

SEQ ID NO:14: one G-C base pair and one C-G base pair were
35 deleted from the stem at the end side of RNA shown by SEQ ID

NO:12.

gggagaggagaagaggaac(F)gc(F)u(F)ac(F)gaggagu(F)agc(F)c(F)ggaaaga
aggc(F)ggc(F)gu(F)agc(F)

5 SEQ ID NO:15: A36 and A37 were deleted from the loop portion of
RNA shown by SEQ ID NO:12.

gggagaggagaagaggaac(F)gc(F)u(F)gc(F)ac(F)gaggagu(F)agc(F)c(F)gg
aaagggc(F)ggc(F)gu(F)gc(F)agc(F)

[0087]

10 SEQ ID NO:16: A23 was deleted from the internal loop portion of
RNA shown by SEQ ID NO:12.

gggagaggagaagaggaac(F)gc(F)u(F)gc(F)ac(F)gagggu(F)agc(F)c(F)gga
aagaaggc(F)ggc(F)gu(F)gc(F)agc(F)

SEQ ID NO:17: one G-C base pair and one C-G base pair were
deleted from the stem at the end side of RNA shown by SEQ ID
15 NO:13.

gggagaggaac(F)gc(F)u(F)ac(F)gaggagu(F)agc(F)c(F)ggaaagaaggc(F)g
gc(F)gu(F)agc(F)

SEQ ID NO:18: 11 nucleotides were deleted from single stranded
part at the 5' end side of RNA shown by SEQ ID NO:17, and GG
20 was added thereto for transcription.

gggc(F)u(F)ac(F)gaggagu(F)agc(F)c(F)ggaaagaaggc(F)ggc(F)gu(F)ag
c(F)

SEQ ID NO:19: one C-G base pair was deleted from stem part at
the end side of RNA shown by SEQ ID NO:17.

25 gggagaggaac(F)gu(F)ac(F)gaggagu(F)agc(F)c(F)ggaaagaaggc(F)ggc(F)
)gu(F)ac(F)

[0088]

SEQ ID NO:20: one C-G base pair and one U-A base pair were
deleted from stem part at the end side of RNA shown by SEQ ID
30 NO:17.

gggagaggaac(F)gac(F)gaggagu(F)agc(F)c(F)ggaaagaaggc(F)ggc(F)gu(
F)c(F)

SEQ ID NO:20-1: single stranded part of RNA shown by SEQ ID
NO:20 was entirely modified with OMe.

35 g(M)g(M)g(M)a(M)g(M)a(M)g(M)g(M)a(M)a(M)c(F)gac(F)gaggagu(F)agc

(F) c(F) ggaaagaaggc(F) ggc(F) gu(F) c(F)

SEQ ID NO:20-2: first stem in RNA shown by SEQ ID NO:20 was modified with OMe.

gggagaggaac(F) g(M) a(M) c(F) g(M) aggagu(F) agc(F) c(F) ggaaagaaggc(F)

5 ggc(F) g(M) u(F) c(F)

SEQ ID NO:20-3: second stem in RNA shown by SEQ ID NO:20 was modified with OMe.

gggagaggaac(F) gac(F) gaggagu(F) ag(M) c(F) c(F) ggaaagaag(M) g(M) c(F) ggc(F) gu(F) c(F)

10 SEQ ID NO:20-4: G in loop part of RNA shown by SEQ ID NO:20 was replaced with OMe.

gggagaggaac(F) gac(F) gaggagu(F) agc(F) c(F) g(M) g(M) aaag(M) aaggc(F) ggc(F) gu(F) c(F)

[0089]

15 SEQ ID NO:20-5: A in bulge part of RNA shown by SEQ ID NO:20-1 was replaced with OMe.

g(M) g(M) g(M) a(M) g(M) a(M) g(M) g(M) a(M) a(M) c(F) gac(F) ga(M) gga(M) gu(F) a(M) gc(F) c(F) ggaaagaaggc(F) ggc(F) gu(F) c(F)

SEQ ID NO:20-6: G in bulge part of RNA shown by SEQ ID NO:20-1

20 was replaced with OMe.

g(M) g(M) g(M) a(M) g(M) a(M) g(M) g(M) a(M) a(M) c(F) gac(F) gag(M) g(M) ag(M) u(F) agc(F) c(F) ggaaagaaggc(F) ggc(F) gu(F) c(F)

SEQ ID NO:20-7: A in loop part of RNA shown by SEQ ID NO:20-1 was modified with OMe.

25 g(M) g(M) g(M) a(M) g(M) a(M) g(M) g(M) a(M) a(M) c(F) gac(F) gaggagu(F) agc(F) c(F) gga(M) aa(M) gaaggc(F) ggc(F) gu(F) c(F)

[0090]

SEQ ID NO:20-8: A in loop part of RNA shown by SEQ ID NO:20-5 was modified with OMe.

30 g(M) g(M) g(M) a(M) g(M) a(M) g(M) g(M) a(M) a(M) c(F) gac(F) ga(M) gga(M) gu(F) a(M) gc(F) c(F) gga(M) aa(M) gaaggc(F) ggc(F) gu(F) c(F)

SEQ ID NO:20-9: first stem in RNA shown by SEQ ID NO:20-5 was modified with OMe.

g(M) g(M) g(M) a(M) g(M) a(M) g(M) g(M) a(M) a(M) c(F) g(M) a(M) c(F) ga(M) gg

35 a(M) gu(F) a(M) gc(F) c(F) ggaaagaaggc(F) ggc(F) g(M) u(F) c(F)

SEQ ID NO:20-10: some parts of RNA shown by SEQ ID NO:20-5 were modified with OMe.

g (M) g (M) g (M) a (M) g (M) a (M) g (M) g (M) a (M) a (M) c (F) gac (F) ga (M) gga (M) gu (F) a (M) gc (F) c (F) ggaaagaaggc (F) g (M) g (M) c (F) gu (F) c (F)

5 SEQ ID NO:20-11: some parts of RNA shown by SEQ ID NO:20-5 were modified with OMe.

g (M) g (M) g (M) a (M) g (M) a (M) g (M) g (M) a (M) a (M) c (F) g (M) a (M) c (F) ga (M) gga (M) gu (F) a (M) gc (F) c (F) gga (M) aa (M) gaaggc (F) g (M) g (M) c (F) g (M) u (F) c (F)

10 SEQ ID NO:20-12: some parts of RNA shown by SEQ ID NO:20-5 were modified with OMe.

g (M) g (M) g (M) a (M) g (M) a (M) g (M) g (M) a (M) a (M) c (F) g (M) a (M) c (F) ga (M) gga (M) gu (F) a (M) gc (F) c (F) gga (M) aa (M) g (M) aaggc (F) ggc (F) g (M) u (F) c (F)

15 SEQ ID NO:20-13: some parts of RNA shown by SEQ ID NO:20-5 were modified with OMe.

g (M) g (M) g (M) a (M) g (M) a (M) g (M) g (M) a (M) a (M) c (F) g (M) a (M) c (F) ga (M) gga (M) gu (F) a (M) gc (F) c (F) gga (M) aa (M) gaag (M) gc (F) ggc (F) g (M) u (F) c (F)
[0091]

20 SEQ ID NO:21: one G-C base pair was deleted from stem part at the loop side of RNA shown by SEQ ID NO:17.

gggagaggaac (F) gc (F) u (F) ac (F) gaggagu (F) agc (F) ggaaagaagc (F) ggc (F) gu (F) agc (F)

25 SEQ ID NO:22: 11 nucleotides were deleted from single stranded part at the 5' end side of RNA shown by SEQ ID NO:20, and two Gs were added for transcription.

gggac (F) gaggagu (F) agc (F) c (F) ggaaagaaggc (F) ggc (F) gu (F) c (F)
[0092]

SEQ ID NO:23: the loop portion was replaced with GAAA tetra loop in RNA shown by SEQ ID NO:20.

30 gggagaggaac (F) gac (F) gaggagu (F) agc (F) c (F) gaaaggc (F) ggc (F) gu (F) c (F)

SEQ ID NO:24: the loop portion was replaced with UUCG tetra loop in RNA shown by SEQ ID NO:20.

35 gggagaggaac (F) gac (F) gaggagu (F) agc (F) c (F) u (F) u (F) c (F) gggc (F) ggc (F) gu (F) c (F)

SEQ ID NO:25: the internal loop portion in RNA shown by SEQ ID NO:20 was replaced with the internal loop of aptamer shown by SEQ ID NO:2.

5 gggagaggaac(F)gac(F)gagaac(F)agc(F)c(F)ggaaagaaggc(F)ggc(F)gu(F)
)c(F)

SEQ ID NO:26: G18 of internal loop in RNA shown by SEQ ID NO:20 was deleted.

gggagaggaac(F)gac(F)gagagu(F)agc(F)c(F)ggaaagaaggc(F)ggc(F)gu(F)
)c(F)

10 SEQ ID NO:27: A19 of internal loop in RNA shown by SEQ ID NO:20 was deleted.

gggagaggaac(F)gac(F)gaggu(F)agc(F)c(F)ggaaagaaggc(F)ggc(F)gu(F)
)c(F)

15 SEQ ID NO:28: two G were removed from the 5' end and the second base pair A-U was changed to G-C in RNA shown by SEQ ID NO:22.

ggc(F)gaggagu(F)agc(F)c(F)ggaaagaaggc(F)ggc(F)gc(F)c(F)

SEQ ID NO:29: two G were removed from the 5' end of RNA shown by SEQ ID NO:22.

gac(F)gaggagu(F)agc(F)c(F)ggaaagaaggc(F)ggc(F)gu(F)c(F)

20 [0093]

The cell migration inhibitory activity of the aptamer shown by SEQ ID NO:4 against mouse midkine was examined. The experimental method was the same as that for the above-described experiment on human midkine. As a result of the
25 experiment, the inhibitory activity % of this aptamer was 50%. This is equivalent to about 57 relative to the inhibitory activity of this aptamer against human midkine taken as 100; the activity decreased evidently, compared with the inhibitory activity against human midkine. Thus, this aptamer was found
30 to be an aptamer that exhibits a higher inhibitory activity against human midkine.

[0094]

As shown in Table 3, the aptamer shown by SEQ ID NO:4, which was originally 77 nucleotides long, could be miniaturized
35 to 31 nucleotides, without considerably reducing the activity

(SEQ ID NO:28, 29). The hairpin loop portion of this aptamer obtained need not always be GGAAAGAA; the aptamer retained the activity even when the hairpin loop portion was the GAAA or UUCG tetra-loop (SEQ ID NO:23, 24). Even when the internal
5 loop portion was replaced with the internal loop portion of the aptamer shown by SEQ ID NO:2, the activity was retained (SEQ ID NO:25). Even when A19 was deleted, the activity was retained, but when G18 was deleted, the activity decreased extremely (SEQ ID NO:26, 27). Meanwhile, it was found that when the C-G base
10 pair of the stem on the loop side was deleted, the secondary structure changed widely and the inhibitory activity was lost (SEQ ID NO:21). From above, it was found that the 42-nucleotide aptamer shown by SEQ ID NO:20 (FIG. 8) retained the activity even after some nucleotides are replaced with other
15 nucleotides or deleted, provided that the basic structure thereof did not change widely.

[Example 7]

[0095]

Miniaturization and stabilization of the aptamer shown by SEQ
20 ID NO:5

The aptamer shown by SEQ ID NO:5 is 77 nucleotides long, having the 2'-position of the ribose of the pyrimidine nucleotide fluoro-substituted. To enable the chemical synthesis, to reduce the toxicity, and to improve the stability
25 in the blood, miniaturization and stabilization of this aptamer were performed. The operations of miniaturization and stabilization were performed on the basis of the secondary structure estimated by the MFOLD program, and the activity was evaluated by a cell migration inhibition experiment. The RNA
30 concentration in the cell migration inhibition experiment was 100 nM or 500 nM. Since some errors occur in experimental results depending on cell condition, a previously assayed sample was included as a positive control in each measurement. The inhibitory activities obtained when the RNA concentration
35 was 100 nM are shown in Table 4-1. The inhibitory activities

are expressed as relative values with the activity of the aptamer shown by SEQ ID NO:5 taken as 100, so as to clarify the activity differences among the altered forms. The inhibitory activity % of the aptamer shown by SEQ ID NO:5 (a value
 5 obtained by subtracting the number of cells moving with the addition of the aptamer from 100, which is the number of cells moving without the addition of the aptamer) was 76% when the RNA concentration was 100 nM. This is the mean for 14 measurements. With the RNA concentration changed to 500 nM, a
 10 similar experiment was performed. The results are shown in Table 4-2 (Table 4-2-1, Table 4-2-2). Activities are expressed as relative values with the activity of the aptamer shown by SEQ ID NO:40 taken as 100. The inhibitory activity % of the aptamer shown by SEQ ID NO:40 was 82%. This is the mean for 4
 15 measurements.

[0096]

[Table 4-1]

SEQ ID NO	Midkine		Pleiotrophin		length (nt)
	activity	Number of measurements	activity	Number of measurements	
5	100	14	13	6	77
30	44	2	-	-	71
31	94	6	17	4	67
32	100	6	11	4	57
33	40	6	5	4	61
34	0	2	-	-	46
35	90	4	0	2	51
36	91	4	27	2	53
36-1	60	4	0	2	53
37	0	2	-	-	49
38	0	2	-	-	57
39	52	2	-	-	45
40	98	4	0	2	49
40-1	80	2	-	-	49
40-2	31	2	-	-	49
40-3	65	2	-	-	49

41	97	4	8.1	2	52
42	110	4	8.7	2	52
43	42	2	-	-	52

The RNA concentration was 100 nM. The activities are expressed as relative values with the inhibitory activity of the RNA shown by SEQ ID NO:5 against midkine taken as 100. The inhibitory activity % of the RNA shown by SEQ ID NO:5 against midkine was 76%. This value is the mean for 14 measurements.

[0097]

[Table 4-2-1]

SEQ ID NO	Activity	Number of measurements	Length (nt)
40	100	2	49
40-1	99	2	49
40-2	88	2	49
40-3	100	2	49
44	100	2	47
45	100	2	45
45-1	100	2	45
45-2	100	2	45
45-3	56	2	45
45-4	100	2	45
45-4-1	98*	2	45
45-4-1-1	85*	2	45
46	92	2	49
47	84	2	48
48	60	2	48
49	69	2	48
50	91	2	43
51	100	2	51
52	100	2	51
53	100	2	51
54	100	2	45
55	100	2	43
56	100	2	43
57	100	2	43

58	100	2	43
59	53	2	29
60	70	2	35

[0098]

[Table 4-2-2]

SEQ ID NO	Activity	Number of measurements	Length (nt)
61	100	2	39
61-1	45*	2	39
61-2	55*	2	39
61-3	80	2	39
61-4	86	4	39
61-5	40	4	39
61-6	57	2	39
61-7	46	2	39
61-8	54	4	39
61-9	39	2	39
62	44	2	39
63	97	2	45
64	55*	2	37
65	0	2	39
66	51	2	38
67	110	2	38
68	72	2	39
69	60	2	39
70	110	2	39
tRNA	28	2	
Thrombin-S	0	2	
HIV-S	48	2	

The RNA concentration was 500 nM. The activities are expressed
 5 as relative values with the inhibitory activity of the RNA
 shown by SEQ ID NO:40 against midkine taken as 100. The
 inhibitory activity % of the RNA shown by SEQ ID NO:40 against
 midkine was 82%. These values are means for 4 measurements.

*: tentatively identified value

[0099]

The altered parts in the altered forms (SEQ ID NOs:30-70) are explained below.

5 SEQ ID NO:30: 6 nucleotides were deleted from single stranded part at the 5' end side of RNA shown by SEQ ID NO:5, and one G was added for transcription.

ggagaagaggaagu(F) gu(F) gc(F) ac(F) aggggu(F) u(F) ggu(F) gu(F) c(F) ggg
u(F) gc(F) au(F) ac(F) agu(F) au(F) aagau(F) agaggac(F) aggaau(F) gagga

10 SEQ ID NO:31: 10 nucleotides were deleted from single stranded part at the 3' end side of RNA shown by SEQ ID NO:5.

gggagaggagaagaggaagu(F) gu(F) gc(F) ac(F) aggggu(F) u(F) ggu(F) gu(F) c
(F) ggggu(F) gc(F) au(F) ac(F) agu(F) au(F) aagau(F) agaggac(F) a

SEQ ID NO:32: 20 nucleotides were deleted from single stranded part at the 3' end side of RNA shown by SEQ ID NO:5.

15 gggagaggagaagaggaagu(F) gu(F) gc(F) ac(F) aggggu(F) u(F) ggu(F) gu(F) c
(F) ggggu(F) gc(F) au(F) ac(F) agu(F) au(F) aag

SEQ ID NO:33: 6 nucleotides were deleted from single stranded part at the 5' end side and 10 nucleotides were deleted from single stranded part at the 3' end side of RNA shown by SEQ ID
20 NO:5.

ggagaagaggaagu(F) gu(F) gc(F) ac(F) aggggu(F) u(F) ggu(F) gu(F) c(F) ggg
u(F) gc(F) au(F) ac(F) agu(F) au(F) aagau(F) agaggac(F) a

[0100]

25 SEQ ID NO:34: 12 nucleotides were deleted from single stranded part at the 5' end side and 20 nucleotides were deleted from single stranded part at the 3' end side of RNA shown by SEQ ID NO:5.

ggaggaagu(F) gu(F) gc(F) ac(F) aggggu(F) u(F) ggu(F) gu(F) c(F) ggggu(F) g
c(F) au(F) ac(F) agu(F) au(F) aag

30 SEQ ID NO:35: 6 nucleotides were deleted from single stranded part at the 3' end side of RNA shown by SEQ ID NO:32.

gggagaggagaagaggaagu(F) gu(F) gc(F) ac(F) aggggu(F) u(F) ggu(F) gu(F) c
(F) ggggu(F) gc(F) au(F) ac(F) ag

35 SEQ ID NO:36: two base pairs were deleted from the stem at the end side of RNA shown by SEQ ID NO:32.

gggagaggagaagaggaagu(F)gc(F)ac(F)aggggu(F)u(F)ggu(F)gu(F)c(F)gg
gu(F)gc(F)ac(F)agu(F)au(F)aag

SEQ ID NO:36-1: single stranded part at the 5' end side of RNA shown by SEQ ID NO:36 was entirely modified with OMe.

5 g(M)g(M)g(M)a(M)g(M)a(M)g(M)g(M)a(M)g(M)a(M)a(M)g(M)a(M)g(M)g(M)
)a(M)a(M)gu(F)gc(F)ac(F)aggggu(F)u(F)ggu(F)gu(F)c(F)gggu(F)gc(F)
)ac(F)agu(F)au(F)aag

SEQ ID NO:37: four base pairs were deleted from the stem at the end side of RNA shown by SEQ ID NO:32.

10 gggagaggagaagaggaagc(F)ac(F)aggggu(F)u(F)ggu(F)gu(F)c(F)gggu(F)
gc(F)agu(F)au(F)aag

SEQ ID NO:38: single stranded part at the 5' end side of RNA shown by SEQ ID NO:32 was changed to poly U where U shows fluorinated ribose at 2'-position.

15 ggggu(F)u(F)u(F)u(F)u(F)u(F)u(F)u(F)u(F)u(F)u(F)u(F)u(F)u(F)u(F)
gu(F)gu(F)gc(F)ac(F)aggggu(F)u(F)ggu(F)gu(F)c(F)gggu(F)gc(F)au(
F)ac(F)agu(F)au(F)aag

[0101]

SEQ ID NO:39: 6 nucleotides were deleted from single stranded
20 part at the 3' end side and one base pair was deleted from the stem at the end side of RNA shown by SEQ ID NO:36.

gggagaggagaagaggaaggc(F)ac(F)aggggu(F)u(F)ggu(F)gu(F)c(F)gggu(F)
)gc(F)c(F)ag

SEQ ID NO:40: 8 nucleotides were deleted from single stranded
25 part at the 3' end side of RNA shown by SEQ ID NO:36.

gggagaggagaagaggaagu(F)gu(F)gc(F)ac(F)aggggu(F)u(F)ggu(F)gu(F)c
(F)gggu(F)gc(F)au(F)ac(F)

SEQ ID NO:40-1: polyethylene glycol with molecular weight of 2000 was added to the 5' end via C12 linker and idT was added
30 to the 3' end of RNA shown by SEQ ID NO:40.

PEG2000-C12-

gggagaggagaagaggaagu(F)gu(F)gc(F)ac(F)aggggu(F)u(F)ggu(F)gu(F)c
(F)gggu(F)gc(F)au(F)ac(F)-idT

SEQ ID NO:40-2: All G in single stranded part at the 5' end
35 side of RNA shown by SEQ ID NO:40 was modified with OMe.

g (M) g (M) g (M) ag (M) ag (M) g (M) ag (M) aag (M) ag (M) g (M) aagu (F) gu (F) gc (F)
ac (F) aggggu (F) u (F) ggu (F) gu (F) c (F) ggggu (F) gc (F) au (F) ac (F)

SEQ ID NO:40-3: All A in single stranded part at the 5' end
side of RNA shown by SEQ ID NO:40 was entirely modified with
5 OMe.

ggga (M) ga (M) gga (M) ga (M) a (M) ga (M) gga (M) a (M) gu (F) gu (F) gc (F) ac (F) a
gggggu (F) u (F) ggu (F) gu (F) c (F) ggggu (F) gc (F) au (F) ac (F)

SEQ ID NO:41: G5 was deleted from single stranded part at the
5' end side of RNA shown by SEQ ID NO:36.

10 gggaaggagaagaggaagu (F) gc (F) ac (F) aggggu (F) u (F) ggu (F) gu (F) c (F) ggg
u (F) gc (F) ac (F) agu (F) au (F) aag

SEQ ID NO:42: A11 was deleted from single stranded part at the
5' end side of RNA shown by SEQ ID NO:36.

gggagaggagagaggaagu (F) gc (F) ac (F) aggggu (F) u (F) ggu (F) gu (F) c (F) ggg
15 u (F) gc (F) ac (F) agu (F) au (F) aag
[0102]

SEQ ID NO:43: A17 was deleted from single stranded part at the
5' end side of RNA shown by SEQ ID NO:36.

gggagaggagaagaggagu (F) gc (F) ac (F) aggggu (F) u (F) ggu (F) gu (F) c (F) ggg
20 u (F) gc (F) ac (F) agu (F) au (F) aag

SEQ ID NO:44: one base pair was deleted from the stem at the
end side of RNA shown by SEQ ID NO:40.

gggagaggagaagaggaagu (F) u (F) gc (F) ac (F) aggggu (F) u (F) ggu (F) gu (F) c (F)
(F) ggggu (F) gc (F) aac (F)

25 SEQ ID NO:45: two base pairs were deleted from the stem at the
end side of RNA shown by SEQ ID NO:40.

gggagaggagaagaggaagu (F) gc (F) ac (F) aggggu (F) u (F) ggu (F) gu (F) c (F) gg
gu (F) gc (F) ac (F)

SEQ ID NO:45-1: polyethylene glycol with molecular weight of
30 2000 was added to the 5' end via C12 linker and idT was added
to the 3' end of RNA shown by SEQ ID NO:45.

PEG2000-C12-

ggga (M) ga (M) gga (M) ga (M) a (M) ga (M) gga (M) a (M) gu (F) gc (F) ac (F) aggggu
(F) u (F) ggu (F) gu (F) c (F) ggggu (F) gc (F) ac (F) -idT

35 SEQ ID NO:45-2: all A in single stranded part and all G in loop

part at the 5' end side of RNA shown by SEQ ID NO:45 were entirely modified with OMe.

ggga (M) ga (M) gga (M) ga (M) a (M) ga (M) gga (M) a (M) gu (F) gc (F) ac (F) agggg (M) u (F) u (F) g (M) g (M) u (F) g (M) u (F) c (F) gggu (F) gc (F) ac (F)

- 5 SEQ ID NO:45-3: all A in single stranded part and all A and G in internal loop part at the 5' end side of RNA shown by SEQ ID NO:45 were entirely modified with OMe.

ggga (M) ga (M) gga (M) ga (M) a (M) ga (M) gga (M) a (M) gu (F) gc (F) ac (F) a (M) g (M) gggu (F) u (F) gggu (F) gu (F) c (F) g (M) g (M) gu (F) gc (F) ac (F)

- 10 SEQ ID NO:45-4: all A in single stranded part at the 5' end side and all A and G in stem part at the end side of RNA shown by SEQ ID NO:45 were entirely modified with OMe.

ggga (M) ga (M) gga (M) ga (M) a (M) ga (M) gga (M) a (M) gu (F) g (M) c (F) a (M) c (F) aggggu (F) u (F) gggu (F) gu (F) c (F) gggu (F) g (M) c (F) a (M) c (F)

- 15 SEQ ID NO:45-4-1: all G in loop part of RNA shown by SEQ ID NO:45-4 was entirely modified with OMe.

ggga (M) ga (M) gga (M) ga (M) a (M) ga (M) gga (M) a (M) g (M) u (F) g (M) c (F) a (M) c (F) aggg (M) g (M) u (F) u (F) g (M) g (M) u (F) g (M) u (F) c (F) gggu (F) g (M) c (F) a (M) c (F)

- 20 SEQ ID NO:45-4-1-1: C24 of RNA shown by SEQ ID NO:45-4-1 was changed to RNA nucleotide.

ggga (M) ga (M) gga (M) ga (M) a (M) ga (M) gga (M) a (M) g (M) u (F) g (M) c (F) a (M) c (F) aggg (M) g (M) u (F) u (F) g (M) g (M) u (F) g (M) u (F) c (F) gggu (F) g (M) c (F) a (M) c (F)

- 25 [0103]

SEQ ID NO:46: A-U base pair was replaced with G-C base pair in the stem at the end side of RNA shown by SEQ ID NO:40.

gggagaggagaagaggaagu (F) gc (F) gc (F) gc (F) aggggu (F) u (F) gggu (F) gu (F) c (F) gggc (F) gc (F) gu (F) ac (F)

- 30 SEQ ID NO:47: U32 was deleted from the loop of RNA shown by SEQ ID NO:40.

gggagaggagaagaggaagu (F) gu (F) gc (F) ac (F) aggggu (F) gggu (F) gu (F) c (F) gggu (F) gc (F) au (F) ac (F)

- SEQ ID NO:48: G34 was deleted from the loop of RNA shown by SEQ ID NO:40.

gggagaggagaagaggaagu(F) gu(F) gc(F) ac(F) aggggu(F) u(F) gu(F) gu(F) c(F)
F) ggu(F) gc(F) au(F) ac(F)

SEQ ID NO:49: U36 was deleted from the loop of RNA shown by SEQ
ID NO:40.

5 gggagaggagaagaggaagu(F) gu(F) gc(F) ac(F) aggggu(F) u(F) ggu(F) c(F) g
gu(F) gc(F) au(F) ac(F)

SEQ ID NO:50: G4 and G10 were deleted from single stranded part
at the 5' end side of RNA shown by SEQ ID NO:45.

gggaaggaaagaggaagu(F) gc(F) ac(F) aggggu(F) u(F) ggu(F) gu(F) c(F) ggu
10 (F) gc(F) ac(F)
[0104]

SEQ ID NO:51: G5 and A11 were deleted from single stranded part
at the 5' end side of RNA shown by SEQ ID NO:36.

gggaaggagagaggaagu(F) gc(F) ac(F) aggggu(F) u(F) ggu(F) gu(F) c(F) ggu
15 (F) gc(F) ac(F) agu(F) au(F) aag

SEQ ID NO:52: G1 and G5 were deleted from single stranded part
at the 5' end side of RNA shown by SEQ ID NO:36.

ggaaggagaagaggaagu(F) gc(F) ac(F) aggggu(F) u(F) ggu(F) gu(F) c(F) ggu
(F) gc(F) ac(F) agu(F) au(F) aag

20 SEQ ID NO:53: G5 and G10 were deleted from single stranded part
at the 5' end side of RNA shown by SEQ ID NO:36.

gggaaggaaagaggaagu(F) gc(F) ac(F) aggggu(F) u(F) ggu(F) gu(F) c(F) ggu
(F) gc(F) ac(F) agu(F) au(F) aag

SEQ ID NO:54: all G was modified with F and all A was modified
25 with OMe in single stranded part at the 5' end side of RNA
shown by SEQ ID NO:45.

g(F) g(F) g(F) a(M) g(F) a(M) g(F) g(F) a(M) g(F) a(M) a(M) g(F) a(M) g(F) g(F)
) a(M) a(M) gu(F) gc(F) ac(F) aggggu(F) u(F) ggu(F) gu(F) c(F) ggu(F) gc(F)
) ac(F)

30 SEQ ID NO:55: A11 and A12 were deleted from single stranded
part at the 5' end side of RNA shown by SEQ ID NO:45.

gggagaggaggaggaagu(F) gc(F) ac(F) aggggu(F) u(F) ggu(F) gu(F) c(F) ggu
(F) gc(F) ac(F)
[0105]

35 SEQ ID NO:56: G13 and A14 were deleted from single stranded

part at the 5' end side of RNA shown by SEQ ID NO:45.

gggagaggagaaggaagu(F)gc(F)ac(F)aggggu(F)u(F)ggu(F)gu(F)c(F)gggu
(F)gc(F)ac(F)

SEQ ID NO:57: G15 and G16 were deleted from single stranded
5 part at the 5' end side of RNA shown by SEQ ID NO:45.

gggagaggagaagaaagu(F)gc(F)ac(F)aggggu(F)u(F)ggu(F)gu(F)c(F)gggu
(F)gc(F)ac(F)

SEQ ID NO:58: A17 and A18 were deleted from single stranded
part at the 5' end side of RNA shown by SEQ ID NO:45.

10 gggagaggagaagaggggu(F)gc(F)ac(F)aggggu(F)u(F)ggu(F)gu(F)c(F)gggu
(F)gc(F)ac(F)

SEQ ID NO:59: 18 nucleotides were deleted from single stranded
part at the 5' end side of RNA shown by SEQ ID NO:45, and two
Gs were added for transcription.

15 ggggu(F)gc(F)ac(F)aggggu(F)u(F)ggu(F)gu(F)c(F)gggu(F)gc(F)ac(F)

SEQ ID NO:60: single stranded part at the 5' end side of RNA
shown by SEQ ID NO:45 was changed to GGGAAGGA.

gggaaggagu(F)gc(F)ac(F)aggggu(F)u(F)ggu(F)gu(F)c(F)gggu(F)gc(F)
ac(F)

20 [0106]

SEQ ID NO:61: G5, G10, A11, A12, G13 and A14 were deleted from
single stranded part at the 5' end side of RNA shown by SEQ ID
NO:45.

gggaaggaggaagu(F)gc(F)ac(F)aggggu(F)u(F)ggu(F)gu(F)c(F)gggu(F)g
25 c(F)ac(F)

SEQ ID NO:61-1: G was modified with DNA nucleotide and A was
modified with OMe in single stranded part, and G in loop part
was modified with OMe at the 5' end side of RNA shown by SEQ ID
NO:61.

30 g(H)g(H)g(H)a(M)a(M)g(H)g(H)a(M)g(H)g(H)a(M)a(M)gu(F)gc(F)ac(F)
aggggu(F)u(F)ggu(F)gu(F)c(F)gggu(F)gc(F)ac(F)

SEQ ID NO:61-2: G and A in single stranded part and G in loop
part at the 5' end side of RNA shown by SEQ ID NO:61 were
modified with OMe.

35 g(M)g(M)g(M)a(M)a(M)g(M)g(M)a(M)g(M)g(M)a(M)a(M)gu(F)gc(F)ac(F)

aggggu(F)u(F)ggu(F)gu(F)c(F)gggu(F)gc(F)ac(F)

SEQ ID NO:61-3: some part of RNA shown by SEQ ID NO:61 were modified with F and OMe.

g(F)g(F)g(F)a(M)a(M)g(F)g(F)a(M)g(F)g(F)a(M)a(M)g(M)u(F)g(M)c(F)
5)a(M)c(F)a(M)g(F)g(M)g(M)g(M)u(F)u(F)g(M)g(M)u(F)g(M)u(F)c(F)g(F)g(F)g(M)u(F)g(M)c(F)a(M)c(F)

SEQ ID NO:61-4: some part of RNA shown by SEQ ID NO:61 were modified with OMe.

ggga(M)a(M)gga(M)gga(M)a(M)g(M)u(F)g(M)c(F)a(M)c(F)aggg(M)g(M)u
10 (F)u(F)g(M)g(M)u(F)g(M)u(F)c(F)gggu(F)g(M)c(F)a(M)c(F)
[0107]

SEQ ID NO:61-5: branched 40 kDa polyethylene glycol chain was added to the 5' end and idT was added to the 3' end of RNA shown by SEQ ID NO:61-5.

15 PEG40k-

ggga(M)a(M)gga(M)gga(M)a(M)g(M)u(F)g(M)c(F)a(M)c(F)aggg(M)g(M)u
(F)u(F)g(M)g(M)u(F)g(M)u(F)c(F)gggu(F)g(M)c(F)a(M)c(F)-idT

SEQ ID NO:61-6: 30 kDa polyethylene glycol chain was added to the both ends of RNA shown by SEQ ID NO:61-5.

20 PEG30k-

ggga(M)a(M)gga(M)gga(M)a(M)g(M)u(F)g(M)c(F)a(M)c(F)aggg(M)g(M)u
(F)u(F)g(M)g(M)u(F)g(M)u(F)c(F)gggu(F)g(M)c(F)a(M)c(F)-PEG30k

SEQ ID NO:61-7: some part of RNA shown by SEQ ID NO:61 were modified with OMe.

25 ggga(M)a(M)gga(M)gga(M)a(M)g(M)u(F)g(M)c(F)a(M)c(F)aggg(M)g(M)u
(F)u(F)g(M)g(M)u(F)g(M)u(F)c(F)g(M)g(M)gu(F)g(M)c(F)a(M)c(F)

SEQ ID NO:61-8: some part of RNA shown by SEQ ID NO:61 were modified with OMe.

ggga(M)a(M)gga(M)gga(M)a(M)g(M)u(F)g(M)c(F)a(M)c(F)a(M)g(M)gg(M)
30)g(M)u(F)u(F)g(M)g(M)u(F)g(M)u(F)c(F)gggu(F)g(M)c(F)a(M)c(F)

SEQ ID NO:61-9: some part of RNA shown by SEQ ID NO:61 were modified with OMe and 2 kDa polyethylene glycol was added to the 5' end.

PEG2000-

35 ggga(M)a(M)gga(M)gga(M)a(M)g(M)u(F)g(M)c(F)a(M)c(F)a(M)gg(M)g(M)

)g(M)u(F)u(F)g(M)g(M)u(F)g(M)u(F)c(F)ggg(M)u(F)g(M)c(F)a(M)c(F)
[0108]

SEQ ID NO:62: G13, A14, G15, G16, A17 and A18 were deleted from
single stranded part at the 5' end side of RNA shown by SEQ ID
5 NO:45.

gggagaggagaagu(F)gc(F)ac(F)aggggu(F)u(F)ggu(F)gu(F)c(F)gggu(F)g
c(F)ac(F)

SEQ ID NO:63: A25 and G26 in RNA shown by SEQ ID NO:45 were
changed to C to make internal loop as stem.

10 gggagaggagaagaggaagu(F)gc(F)ac(F)c(F)c(F)gggu(F)u(F)ggu(F)gu(F)
c(F)gggu(F)gc(F)ac(F)

SEQ ID NO:64: U-A was deleted from the stem at the 5' end side
of RNA shown by SEQ ID NO:61.

gggaaggaggaaggc(F)ac(F)aggggu(F)u(F)ggu(F)gu(F)c(F)gggu(F)gc(F)
15 c(F)

SEQ ID NO:65: A19 and G20 in the internal loop of RNA shown by
SEQ ID NO:61 were replaced with C.

gggaaggaggaagu(F)gc(F)ac(F)c(F)c(F)gggu(F)u(F)ggu(F)gu(F)c(F)gg
gu(F)gc(F)ac(F)

20 [0109]

SEQ ID NO:66: some part of RNA shown by SEQ ID NO:61 were
modified with OMe and G was modified with F.

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

SEQ ID NO:67: modification of RNA shown by SEQ ID NO:66 was
changed.

gga(M)a(M)gga(M)gga(M)a(M)g(M)u(F)g(M)c(F)a(M)c(F)aggg(M)g(M)u(
F)u(F)g(M)g(M)u(F)g(M)u(F)c(F)gggu(F)g(M)c(F)a(M)c(F)

30 SEQ ID NO:68: some part of RNA shown by SEQ ID NO:61 were
modified with OMe and U28 was replaced with A(M).

ggga(M)a(M)gga(M)gga(M)a(M)g(M)u(F)g(M)c(F)a(M)c(F)aggg(M)g(M)u(
(F)u(F)g(M)g(M)a(M)g(M)u(F)c(F)gggu(F)g(M)c(F)a(M)c(F)

SEQ ID NO:69: some part of RNA shown by SEQ ID NO:61 were
35 modified with OMe and U25 was replaced with A(M).

ggga (M) a (M) gga (M) gga (M) a (M) g (M) u (F) g (M) c (F) a (M) c (F) aggg (M) g (M) u
(F) a (M) g (M) g (M) u (F) g (M) u (F) c (F) gggu (F) g (M) c (F) a (M) c (F)

SEQ ID NO:70: some part of RNA shown by SEQ ID NO:61 were
modified with OMe and U24 was replaced with A(M).

5 ggga (M) a (M) gga (M) gga (M) a (M) g (M) u (F) g (M) c (F) a (M) c (F) aggg (M) g (M) a
(M) u (F) g (M) g (M) u (F) g (M) u (F) c (F) gggu (F) g (M) c (F) a (M) c (F)
[0110]

Here, n(M) represents ribose modified with OMe at the 2'-
position, n(F) represents ribose modified with F at the 2'-
10 position, n(H) represents deoxyribose, PEG2000 represents a
2000-Da polyethyleneglycol, PEG40k represents a branched 40kDa
polyethyleneglycol, PEG30k represents a 30kDa
polyethyleneglycol, C12 represents a C12 linker, and idT
represents inverted dT.

15 [0111]

An experiment on cell migration inhibition for
pleiotrophin by the aptamer shown by SEQ ID NO:5 and altered
forms thereof was performed. The experimental method was as
described above, except that pleiotrophin was used instead of
20 midkine. The aptamer concentration was 100 nM, and the
inhibitory activity of the aptamer shown by SEQ ID NO:5 against
midkine was taken as 100. As a result of the experiment, the
inhibitory activity against pleiotrophin was 13 (Table 4-1).
This is the mean for 6 measurements. In the altered forms, no
25 remarkable inhibitory activity against pleiotrophin was
observed.

[0112]

The cell migration inhibitory activity of the aptamer
shown by SEQ ID NO:35 against mouse midkine was examined. The
30 experiment was the same as the above-described experimental
method using human midkine. As a result of the experiment, the
inhibitory activity % of this aptamer was 84%. Thus, this
aptamer was found to possess an activity against mouse midkine
equivalent to the inhibitory activity against human midkine.

35 [0113]

Using tRNA (manufactured by Sigma), Thrombin-S, and HIV-S, which are unlikely to bind specifically to midkine, in place of the aptamers, a cell migration inhibition experiment for human midkine was performed as described above. Here, Thrombin-S is
 5 a DNA aptamer of t'ggttggtgtggttggt'aaaaaaaaaaaaaaaa (SEQ ID NO:74), and HIV-S is a DNA aptamer of g'tggtgggtgggtggg't (SEQ ID NO:75). Each "'" represents a phosphorothioate bond. The phosphorothioate bonds were added in order to increase the nuclease resistance. These RNAs were used at 500 nM. When the
 10 inhibitory activity of the aptamer shown by SEQ ID NO:45 against human midkine was taken as 100, the activity of tRNA was determined to be 28, Thrombin-S to be 0, and HIV-S to be 48. Hence, it was suggested that the aptamers prepared in the present study might be bound specifically to important sites
 15 associated with the cell migration activity of midkine.
 [0114]

The aptamer shown by SEQ ID NO:5, which was 77 nucleotides long, could be miniaturized to 39 nucleotides, without considerably reducing the activity (SEQ ID NO:61). The
 20 single-strand portion at the 5' end could not completely be deleted; it is postulated that this single-strand portion is involved in the formation of the steric structure of the aptamer. Although the G of this single-strand portion may be a F-modified nucleotide, it was found that the activity decreased
 25 in the case of OMe-modified nucleotides (SEQ ID NO:40-2, 54, 61-2). Meanwhile, even when the A was an OMe-modified nucleotide, the activity remained unchanged (SEQ ID NO:40-3). Even when some A-U base pairs were replaced with G-C base pairs in the stem on the 5' end side, the activity was not so much
 30 influenced (SEQ ID NO:46). Even when the A and G of this stem portion were replaced with an OMe-modified nucleotide, the activity was retained (SEQ ID NO:45-4). Even when the internal loop portion was replaced with a G-C stem structure by nucleotide substitution, the activity did not change (SEQ ID
 35 NO:63); however, when the single-strand portion was shortened,

the activity decreased (SEQ ID NO:59). When the G and A of the internal loop were replaced with an OMe-modified nucleotide, the activity decreased (SEQ ID NO:45-3). When the loop portion was deprived of 1 nucleotide, the activity decreased (SEQ ID NO:47 to 49). Even when the G of the loop portion was replaced with an OMe-modified nucleotide, the activity was retained (SEQ ID NO:45-2).

From above, it was found that the activity of this aptamer obtained was not influenced even by substituting some bases or changing the modification. It was also found that this aptamer bound specifically to midkine to inhibit the cell migration activity. Meanwhile, it was found that this aptamer also bound to the family protein pleiotrophin, but did not possess a remarkable cell migration inhibitory activity.

[Example 8]

[0115]

Inhibitory effect of aptamer on organ adhesion using mouse postoperative adhesion formation model

The abdomen of a normal mouse is opened, and the peritoneum is incised with a surgical knife and the like, after which the internal organs are dried, and then the laparotomized part is sutured; within 5 days thereafter, organ adhesion is observable (Am J Obstet Gynecol 179, 438-443, 1998). It is reported that when midkine knockout mice were treated using this method for causing postoperative organ adhesion, postoperative organ adhesion did not occur (Biochemical and Biophysical Research Communication, 317, 108-113, 2004). Hence, using the mouse postoperative adhesion formation model, the postoperative organ adhesion preventing effect of the aptamer shown by SEQ ID NO:76 was investigated. Under anesthesia, an 8-week-old C57BL/6 mouse (female) was laparotomized, after which the peritoneum was wiped with absorbent cotton. Thereafter, an about 2 cm fissure was made in the peritoneum at five positions using scissors. After hemostasis with absorbent cotton for 10 minutes, the wound was sutured using a sewing

needle and thread. After emergence, the aptamer shown by SEQ ID NO:76 was intraperitoneally administered at a dose of 1 mg/25 mL/kg. For a control group, saline containing 1 mM MgCl₂ was intraperitoneally administered at a dose of 25 mL/kg in the same manner. The administration took place once a day in a total of three times on postoperative day 0, day 1, and day 2, thereafter the animal was laparotomized under anesthesia on day 3, and the degree of organ adhesion to the wound was evaluated using the criteria shown below.

- 10 0: no adhesion
 1: with adhesion, mild adhesion (mild)
 2: with adhesion, moderate adhesion (moderate)
 3: with adhesion, severe adhesion that cannot be detached even by pulling the organ at the adhering portion (severe)

15 The results are shown as the means and standard errors of scores of the degree of adhesion for 9 to 10 animals in each group (Table 5). As a result, the score was 3 in all animals in the group receiving physiological saline, whereas the mean score of the group receiving the aptamer shown by SEQ ID NO:76 was 2.4. In the group receiving the aptamer shown by SEQ ID NO:76, compared with the group receiving physiological saline, a statistically significant difference ($p < 5\%$) was observed. For the statistical processing, Mann-Whitney U test was used. From the results above, it was demonstrated that the aptamer shown by SEQ ID NO:76 possessed a postoperative organ adhesion preventing activity.

 The aptamer shown by SEQ ID NO:76 is as follows.
 SEQ ID NO:76: the RNA shown by SEQ ID NO:40 wherein all "A"s of the 5' end single-strand portion are modified with OMe, with cholesterol (Chol) added to the 5' end via a saturated hydrocarbon chain (C12) linker having 12 carbon atoms, and inverted dT (idT) added to the 3' end.

Chol-C12-

ggga (M) ga (M) gga (M) ga (M) a (M) ga (M) gga (M) a (M) gu (F) gu (F) gc (F) ac (F) a
 35 ggggu (F) u (F) ggu (F) gu (F) c (F) ggggu (F) gc (F) au (F) ac (F) -idT

[0116]

[Table 5]

Results of organ adhesion inhibition experiment using mouse model

Administration	Score
Physiological saline	3.0 +/- 0.0
SEQ ID NO:40-4-1	2.4 +/- 0.3*

5 *; p<0.05 Mann-Whitney U test

[0117]

This application is based on a patent application No. 2006-308482 filed in Japan (filing date: November 14, 2006),
10 the contents of which are incorporated in full herein by this reference.

Claims

1. An aptamer possessing an inhibitory activity against midkine.
- 5 2. The aptamer of claim 1, wherein the aptamer does not possess an inhibitory activity against pleiotrophin.
3. The aptamer of claim 1, possessing a binding activity to the
10 N-terminal fragment of midkine.
4. The aptamer of claim 1, possessing a binding activity to the C-terminal fragment of midkine.
- 15 5. The aptamer of claim 2, possessing a binding activity to the N-terminal fragment of midkine.
6. The aptamer of claim 2, possessing a binding activity to the C-terminal fragment of midkine.
- 20 7. An aptamer that exhibits an inhibitory activity against midkine by inhibiting the binding of midkine and PTP ζ .
8. The aptamer of claim 1, which is either (a) or (b) below:
25 (a) an aptamer comprising a nucleotide sequence selected from among SEQ ID NO:1 to 70 (with the provision that the uracil may be thymine), wherein the nucleotides contained in the aptamer are such that,
 - (i) the 2'-positions of the pyrimidine nucleotides,
30 whether identical or different, are fluorine atoms or substituted by atoms or groups selected from the group consisting of hydrogen atoms, hydroxy groups and methoxy groups, and
 - (ii) the 2'-positions of the purine nucleotides, whether
35 identical or different, are hydroxy groups or substituted by

atoms or groups selected from the group consisting of hydrogen atoms, methoxy groups and fluorine atoms;

(b) an aptamer comprising a nucleotide sequence selected from among SEQ ID NO:1 to 70 (with the provision that the uracil may
5 be thymine), wherein one or several nucleotides are substituted, deleted, inserted or added, wherein the nucleotides contained in the aptamer are such that,

(i) the 2'-positions of the pyrimidine nucleotides, whether identical or different, are fluorine atoms or
10 substituted by atoms or groups selected from the group consisting of hydrogen atoms, hydroxy groups and methoxy groups, and

(ii) the 2'-positions of the purine nucleotides, whether identical or different, are hydroxy groups or substituted by
15 atoms or groups selected from the group consisting of hydrogen atoms, methoxy groups and fluorine atoms.

9. The aptamer of any one of claims 1 to 8, wherein a nucleotide contained in the aptamer is modified.

20

10. a complex comprising the aptamer of any one of claims 1 to 9 and a functional substance.

11. The complex of claim 10, wherein the functional substance
25 is an affinity substance, a substance for labeling, an enzyme, a drug delivery vehicle or a drug.

12. A pharmaceutical drug comprising the aptamer of any one of claims 1 to 9 or the complex of claim 10 or 11.

30

13. A cell migration inhibitor comprising the aptamer of any one of claims 1 to 9 or the complex of claim 10 or 11.

14. A diagnostic reagent comprising the aptamer of any one of
35 claims 1 to 9 or the complex of claim 10 or 11.

15. A labeling agent comprising the aptamer of any one of claims 1 to 9 or the complex of claim 10 or 11.

5 16. A method of detecting the aptamer of any one of claims 1 to 9 or the complex of claim 10 or 11.

Abstract

Provided is a high-quality aptamer against midkine.

An aptamer possessing an inhibitory activity against
5 midkine; a complex comprising an aptamer possessing a binding
activity or inhibitory activity against midkine and a
functional substance (for example, affinity substances,
substances for labeling, enzymes, drug delivery vehicles, drugs
and the like); a pharmaceutical drug, cell migration inhibitor,
10 diagnostic reagent, labeling agent and the like comprising an
aptamer possessing a binding activity or inhibitory activity
against midkine, or a complex comprising the aptamer and a
functional substance; a cell migration inhibitor, a diagnostic
reagent, a labeling agent and the like.

SEQUENCE LISTING

<110> RIBOMIC INC.

<120> APTAMER AGAINST MIDKINE AND USE THEREOF

<130> 091160

<150> JP 2006-308482

<151> 2006-11-14

<160> 76

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 77

<212> RNA

<213> Artificial

<220>

<223> Aptamer to midkine

<400> 1

gggagaggag aagaggaaau aguuagggu gaauugcga aagcuuuuu agucgcagua 60

gaggacagga augagga 77

<210> 2

<211> 77

<212> RNA

<213> Artificial

<220>

<223> Aptamer to midkine

<400> 2

gggagaggag aagaggaagg acuaaguaag agaaccgg aaugaaggga cuuacgugua 60

gaggacagga augagga 77

<210> 3

<211> 75

<212> RNA

<213> Artificial

<220>

<223> Aptamer to midkine

<400> 3

gggagaggag aagaggaaag ccuucuaacc aaaguggaa agcacacaua aaucugguag 60

aggacaggaa ugaga 75

<210> 4

<211> 76

<212> RNA

<213> Artificial

<220>

<223> Aptamer to midkine

<400> 4

gggagaggag aagaggaacg ugcucuguac gaggaguagc cggaaagaag gcggugugua 60

gaggacagga augaga 76

<210> 5

<211> 76

<212> RNA

<213> Artificial

<220>

<223> Aptamer to midkine

<400> 5

gggagaggag aagaggaagu gugcacaggg guuggugucg ggugcauaca guauaagaua 60

gaggacagga augaga 76

<210> 6

<211> 67

<212> RNA

<213> Artificial

<220>

<223> Aptamer to midkine

<400> 6

gggagaggag aagaggaacg ugcucuguac gaggaguagc cggaaagaag gcggugugua 60

gaggaca 67

<210> 7

<211> 64

<212> RNA

<213> Artificial

<220>

<223> Aptamer to midkine

<400> 7

gggaacgugc ucuguacgag gaguagccgg aaagaaggcg guguguagag gacaggaaug 60

agga 64

<210> 8

<211> 69

<212> RNA

<213> Artificial

<220>

<223> Aptamer to midkine

<400> 8

gggagaggag aagaggaacg cuguacgagg aguagccgga aagaaggcgg uguguagcag 60

gaaugagga 69

<210> 9

<211> 66

<212> RNA

<213> Artificial

<220>

<223> Aptamer to midkine

<400> 9

gggagaggag aagaggaacg ugcucuguac gccggaaga agguguguag aggacaggaa 60

ugagga 66

<210> 10

<211> 73

<212> RNA

<213> Artificial

<220>

<223> Aptamer to midkine

<400> 10
 gggagaggag aagaggaacg ugcucuguac gaggaguagc cgaaaggcgg uguguagagg 60
 acaggaauga gga 73

<210> 11
 <211> 77
 <212> RNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Aptamer to midkine

<400> 11
 gggagaggag aagaggaacg ugcucugcac gaggaguagc cggaaagaag gcggcgugca 60
 gaggacagga augagga 77

<210> 12
 <211> 58
 <212> RNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Aptamer to midkine

<400> 12
 gggagaggag aagaggaacg cugcacgagg aguagccgga aagaaggcgg cgugcagc 58

<210> 13
 <211> 50
 <212> RNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Aptamer to midkine

<400> 13
 gggagaggaa cgcugcacga ggaguagccg gaaagaaggc ggcgugcagc 50

<210> 14
 <211> 54
 <212> RNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Aptamer to midkine

<400> 14
 gggagaggag aagaggaacg cuacgaggag uagccggaaa gaaggcggcg uagc 54

<210> 15
 <211> 56
 <212> RNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Aptamer to midkine

<400> 15
 gggagaggag aagaggaacg cugcacgagg aguagccgga aaggcggcg ugcagc 56

<210> 16
 <211> 57
 <212> RNA
 <213> Artificial

<220>
<223> Aptamer to midkine

<400> 16
gggagaggag aagaggaacg cugcacgagg guagccggaa agaaggcggc gugcagc 57

<210> 17
<211> 46
<212> RNA
<213> Artificial

<220>
<223> Aptamer to midkine

<400> 17
gggagaggaa cgcuaagagg aguagccgga aagaaggcgg cguagc 46

<210> 18
<211> 37
<212> RNA
<213> Artificial

<220>
<223> Aptamer to midkine

<400> 18
gggcuacgag gaguagccgg aaagaaggcg gcguagc 37

<210> 19
<211> 44
<212> RNA
<213> Artificial

<220>
<223> Aptamer to midkine

<400> 19
gggagaggaa cguacgagga guagccggaa agaaggcggc guac 44

<210> 20
<211> 42
<212> RNA
<213> Artificial

<220>
<223> Aptamer to midkine

<400> 20
gggagaggaa cgacgaggag uagccggaaa gaaggcggcg uc 42

<210> 21
<211> 44
<212> RNA
<213> Artificial

<220>
<223> Aptamer to midkine

<400> 21
gggagaggaa cgcuaagagg aguagccgga aagaaggcggc uagc 44

<210> 22
<211> 33
<212> RNA
<213> Artificial

<220>
<223> Aptamer to midkine

<400> 22
gggacgagga guagccggaa agaaggcggc guc 33

<210> 23
<211> 38
<212> RNA
<213> Artificial

<220>
<223> Aptamer to midkine

<400> 23
gggagaggaa cgacgaggag uagccgaaag gcggcguc 38

<210> 24
<211> 38
<212> RNA
<213> Artificial

<220>
<223> Aptamer to midkine

<400> 24
gggagaggaa cgacgaggag uagccuucgg gcggcguc 38

<210> 25
<211> 41
<212> RNA
<213> Artificial

<220>
<223> Aptamer to midkine

<400> 25
gggagaggaa cgacgagaa agccggaaag aaggcggcgu c 41

<210> 26
<211> 41
<212> RNA
<213> Artificial

<220>
<223> Aptamer to midkine

<400> 26
gggagaggaa cgacgagagu agccggaaag aaggcggcgu c 41

<210> 27
<211> 41
<212> RNA
<213> Artificial

<220>
<223> Aptamer to midkine

<400> 27
gggagaggaa cgacgagggu agccggaaag aaggcggcgu c 41

<210> 28
<211> 31
<212> RNA
<213> Artificial

<220>
<223> Aptamer to midkine

<400> 28

ggcgaggagu agccggaaag aaggcggcgc c 31

<210> 29
 <211> 31
 <212> RNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Aptamer to midkine

<400> 29
 gacgaggagu agccggaaag aaggcggcgu c 31

<210> 30
 <211> 71
 <212> RNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Aptamer to midkine

<400> 30
 ggagaagagg aagugugcac agggguuggu gucgggugca uacaguauaa gauagaggac 60

aggaugagg a 71

<210> 31
 <211> 67
 <212> RNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Aptamer to midkine

<400> 31
 ggagaggag aagaggaagu gugcacaggg guuggugucg ggugcauaca guauaagaua 60

gaggaca 67

<210> 32
 <211> 57
 <212> RNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Aptamer to midkine

<400> 32
 ggagaggag aagaggaagu gugcacaggg guuggugucg ggugcauaca guauaag 57

<210> 33
 <211> 61
 <212> RNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Aptamer to midkine

<400> 33
 ggagaagagg aagugugcac agggguuggu gucgggugca uacaguauaa gauagaggac 60

a 61

<210> 34
 <211> 46
 <212> RNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Aptamer to midkine

 <400> 34
 ggaggaagug ugcacagggg uuggugucgg gugcauacag uauaag 46

 <210> 35
 <211> 51
 <212> RNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Aptamer to midkine

 <400> 35
 ggagaggag aagaggaagu ggcacaggg guuggugucg ggugcauaca g 51

 <210> 36
 <211> 53
 <212> RNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Aptamer to midkine

 <400> 36
 ggagaggag aagaggaagu gcacaggggu uggugucggg ugcacaguau aag 53

 <210> 37
 <211> 49
 <212> RNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Aptamer to midkine

 <400> 37
 ggagaggag aagaggaagc acagggguug gugucgggug caguauaag 49

 <210> 38
 <211> 57
 <212> RNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Aptamer to midkine

 <400> 38
 ggguuuuuuu uuuuuuuugu ggcacaggg guuggugucg ggugcauaca guauaag 57

 <210> 39
 <211> 45
 <212> RNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Aptamer to midkine

 <400> 39
 ggagaggag aagaggaagg cacagggguu ggugucgggu gccag 45

 <210> 40
 <211> 49
 <212> RNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Aptamer to midkine

<400> 40
gggagaggag aagaggaagu ggcacaggg ggugugucg ggugcauac 49

<210> 41
<211> 52
<212> RNA
<213> Artificial

<220>
<223> Aptamer to midkine

<400> 41
gggaaggaga agaggaagug cacagggguu ggugucgggu gcacaguaua ag 52

<210> 42
<211> 52
<212> RNA
<213> Artificial

<220>
<223> Aptamer to midkine

<400> 42
gggagaggag agaggaagug cacagggguu ggugucgggu gcacaguaua ag 52

<210> 43
<211> 52
<212> RNA
<213> Artificial

<220>
<223> Aptamer to midkine

<400> 43
gggagaggag aagaggagug cacagggguu ggugucgggu gcacaguaua ag 52

<210> 44
<211> 47
<212> RNA
<213> Artificial

<220>
<223> Aptamer to midkine

<400> 44
gggagaggag aagaggaagu ugcacagggg uggugucgg gugcaac 47

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

<220>
<223> Aptamer to midkine

<400> 45
gggagaggag aagaggaagu gcacaggggu uggugucggg ugcac 45

<210> 46
<211> 49
<212> RNA
<213> Artificial

<220>
<223> Aptamer to midkine

<400> 46

gggagaggag aagaggaagu gcgcgcaggg guuggugucg ggcgcguac 49

<210> 47
 <211> 48
 <212> RNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Aptamer to midkine

<400> 47
 gggagaggag aagaggaagu ggcacacaggg guggugucgg gugcauac 48

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

<220>
 <223> Aptamer to midkine

<400> 48
 gggagaggag aagaggaagu ggcacacaggg guugugucgg gugcauac 48

<210> 49
 <211> 48
 <212> RNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Aptamer to midkine

<400> 49
 gggagaggag aagaggaagu ggcacacaggg guugggucgg gugcauac 48

<210> 50
 <211> 43
 <212> RNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Aptamer to midkine

<400> 50
 gggaaggaaa gaggaagugc acagggguug gugucgggug cac 43

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

<220>
 <223> Aptamer to midkine

<400> 51
 gggaaggaga gaggaagugc acagggguug gugucgggug cacaguauaa g 51

<210> 52
 <211> 51
 <212> RNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Aptamer to midkine

<400> 52
 ggaaggagaa gaggaagugc acagggguug gugucgggug cacaguauaa g 51

<210> 53
 <211> 51
 <212> RNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Aptamer to midkine
 <400> 53
 gggaaggaaa gaggaagugc acagggguug gugucgggug cacaguauaa g 51

<210> 54
 <211> 45
 <212> RNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Aptamer to midkine
 <400> 54
 ggagaggag aaggaaggu gcacaggggu uggugcggg ugcac 45

<210> 55
 <211> 43
 <212> RNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Aptamer to midkine
 <400> 55
 ggagaggag gaggaagugc acagggguug gugucgggug cac 43

<210> 56
 <211> 43
 <212> RNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Aptamer to midkine
 <400> 56
 ggagaggag aaggaagugc acagggguug gugucgggug cac 43

<210> 57
 <211> 43
 <212> RNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Aptamer to midkine
 <400> 57
 ggagaggag aagaaagugc acagggguug gugucgggug cac 43

<210> 58
 <211> 43
 <212> RNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Aptamer to midkine
 <400> 58
 ggagaggag aagaggugc acagggguug gugucgggug cac 43

<210> 59

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

<220>
 <223> Aptamer to midkine

<400> 59
 gggugcacag ggguggugu cgggugcac 29

<210> 60
 <211> 35
 <212> RNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Aptamer to midkine

<400> 60
 gggaaggagu gcacaggggu uggugucggg ugcac 35

<210> 61
 <211> 39
 <212> RNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Aptamer to midkine

<400> 61
 gggaaggagg aagugcacag ggguggugu cgggugcac 39

<210> 62
 <211> 39
 <212> RNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Aptamer to midkine

<400> 62
 gggagaggag aagugcacag ggguggugu cgggugcac 39

<210> 63
 <211> 45
 <212> RNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Aptamer to midkine

<400> 63
 gggagaggag aagaggaagu gcacccgggu uggugucggg ugcac 45

<210> 64
 <211> 37
 <212> RNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Aptamer to midkine

<400> 64
 gggaaggagg aaggcacagg gguugguguc gggugcc 37

<210> 65
 <211> 39
 <212> RNA

<213> Artificial
 <220>
 <223> Aptamer to midkine
 <400> 65
 gggaaggagg aagugcaccg gguuggugu cggugcac 39
 <210> 66
 <211> 38
 <212> RNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Aptamer to midkine
 <400> 66
 ggaaggagga agugcacagg gguugguguc gggugcac 38
 <210> 67
 <211> 38
 <212> RNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Aptamer to midkine
 <400> 67
 ggaaggagga agugcacagg gguugguguc gggugcac 38
 <210> 68
 <211> 39
 <212> RNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Aptamer to midkine
 <400> 68
 gggaaggagg aagugcacag gguuggagu cggugcac 39
 <210> 69
 <211> 39
 <212> RNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Aptamer to midkine
 <400> 69
 gggaaggagg aagugcacag gguaggugu cggugcac 39
 <210> 70
 <211> 39
 <212> RNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Aptamer to midkine
 <400> 70
 gggaaggagg aagugcacag gggauggugu cggugcac 39
 <210> 71
 <211> 77
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> DNA template for producing aptamer to midkine

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

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (20).. (59)
 <223> n is a, c, g, or t

<400> 71
 tcctcattcc tgtcctctan nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnt 60
 tcctctttctc ctctccc 77

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

<220>
 <223> primer for producing aptamer to midkine

<400> 72
 taatacgact cactataggg agaggagaag aggaa 35

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

<220>
 <223> reverse primer for producing aptamer to midkine

<400> 73
 tcctcattcc tgtcctcta 19

<210> 74
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> DNA aptamer to thrombin (Thrombin-S)

<400> 74
 tggttggtgt ggttggtaaa aaaaaaaaaa aaa 33

<210> 75
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> DNA aptamer to HIV (HIV-S)

<400> 75
 gtggtgggtg ggtgggt 17

<210> 76
 <211> 49
 <212> RNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Aptamer to midkine

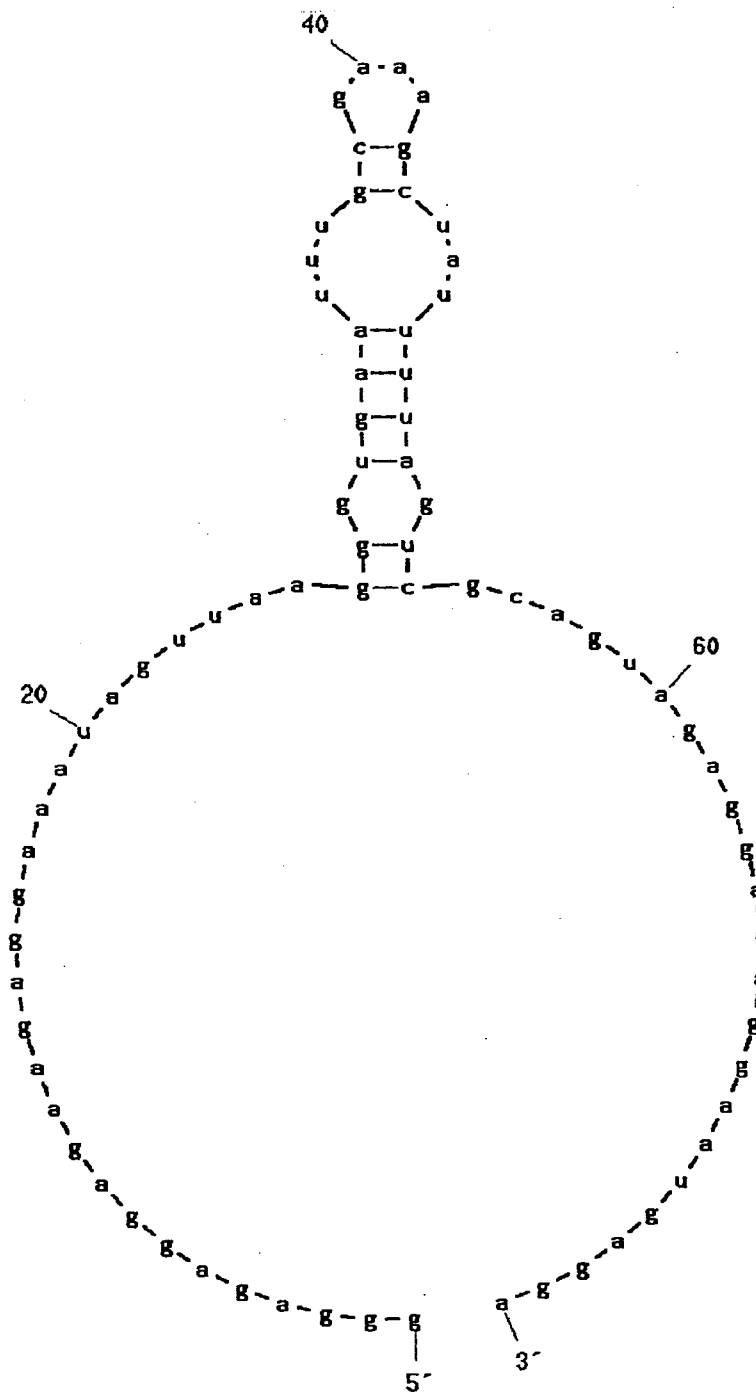
<400> 76

gggagaggag aagaggaagu gugcacaggg guuggugucg ggugcauac

49

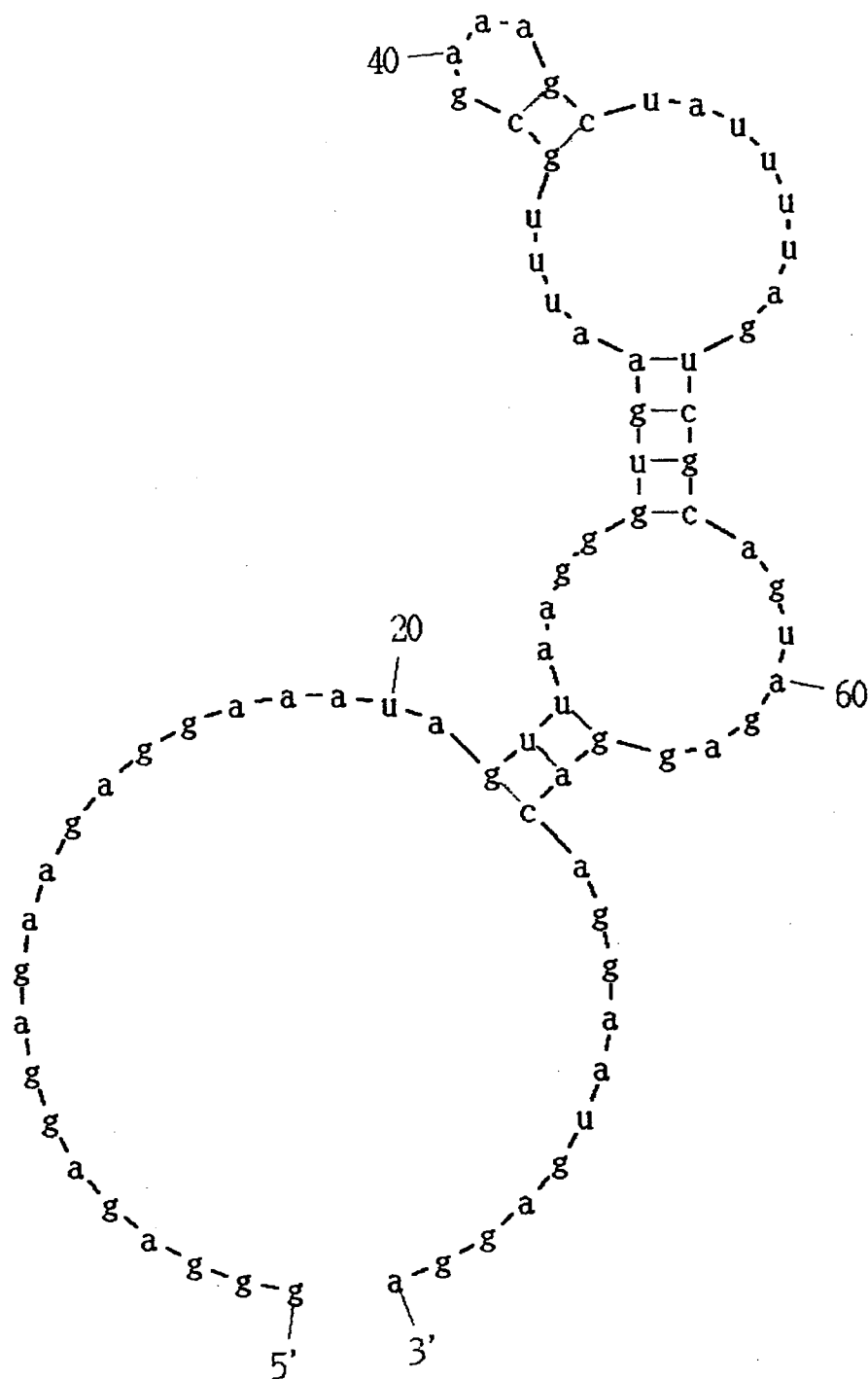
1/12

FIG. 1A



2/12

FIG. 1B



3/12

FIG. 2A

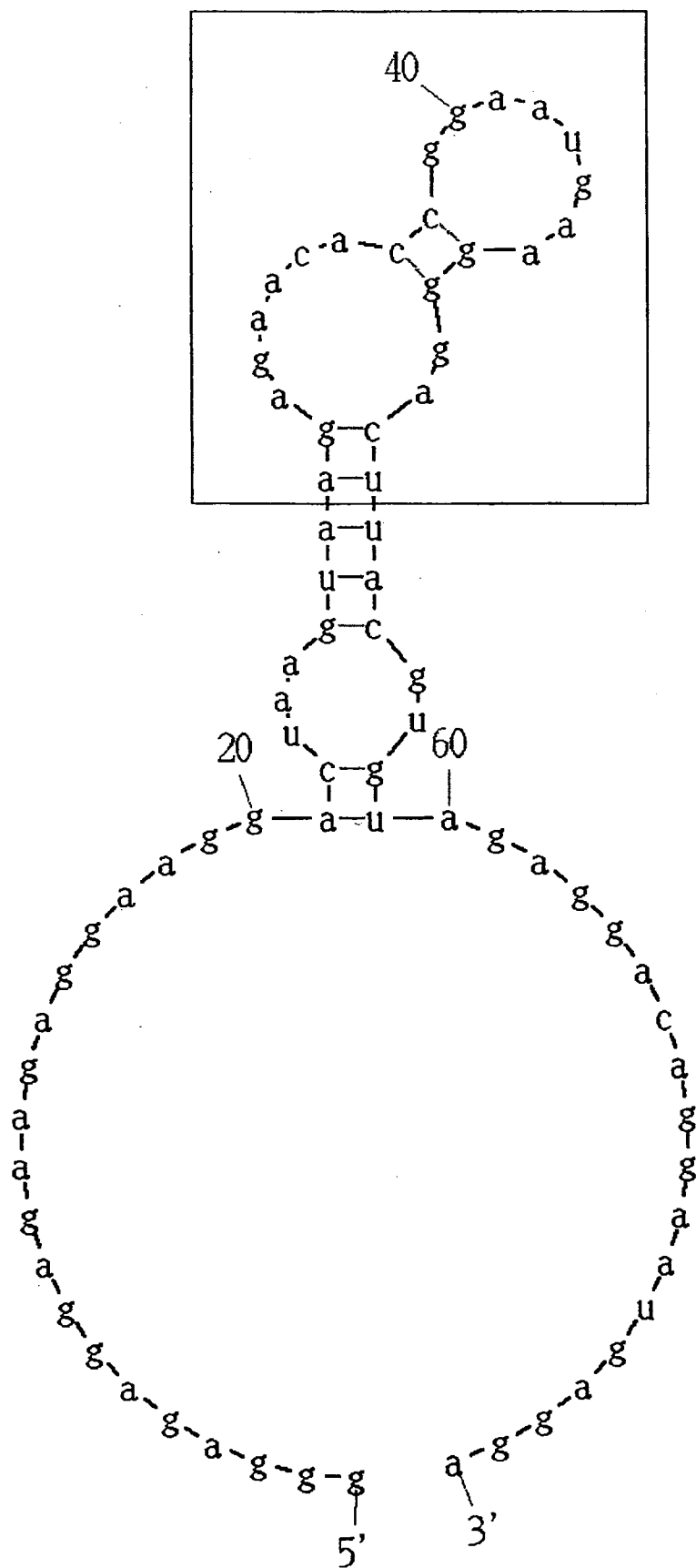
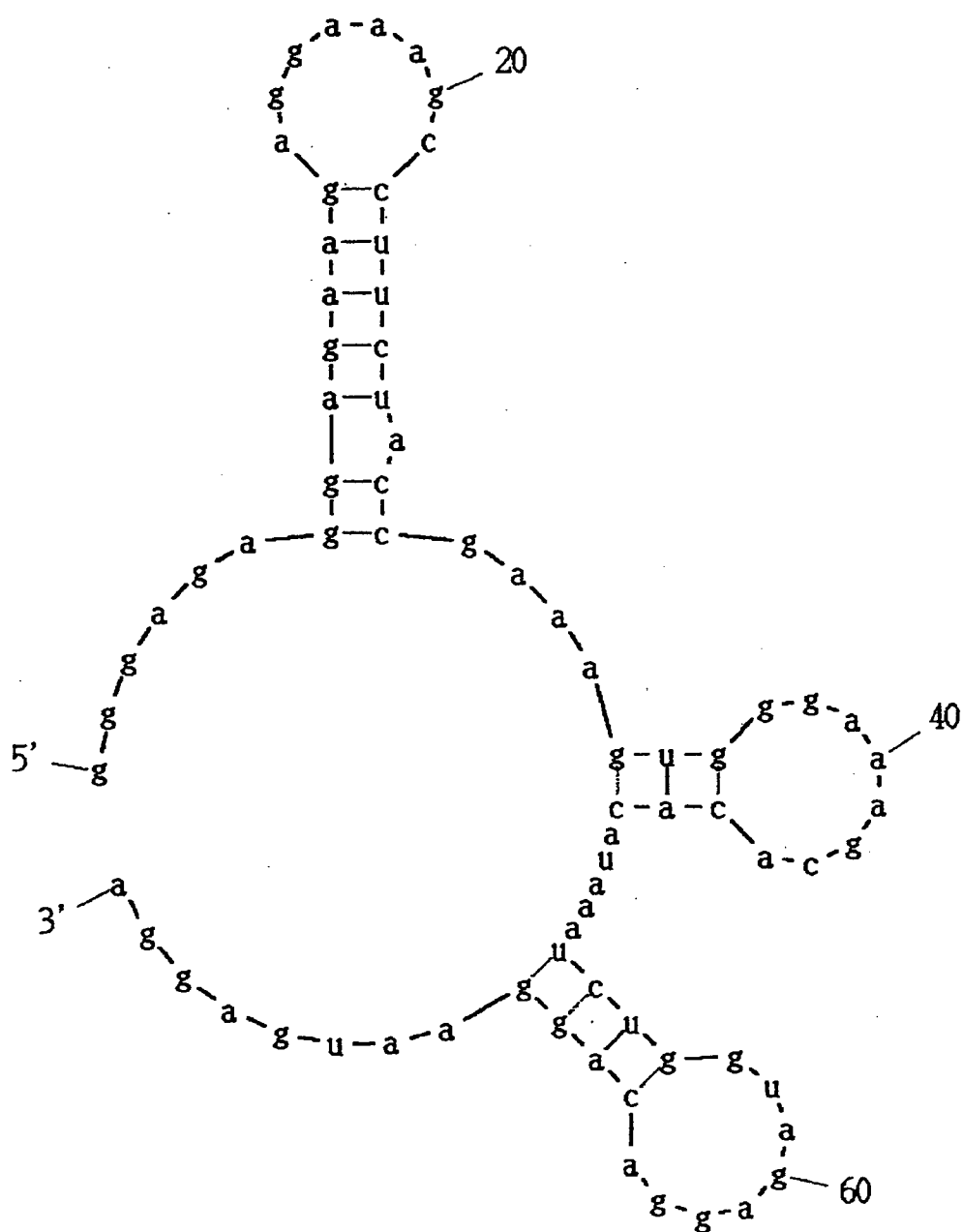
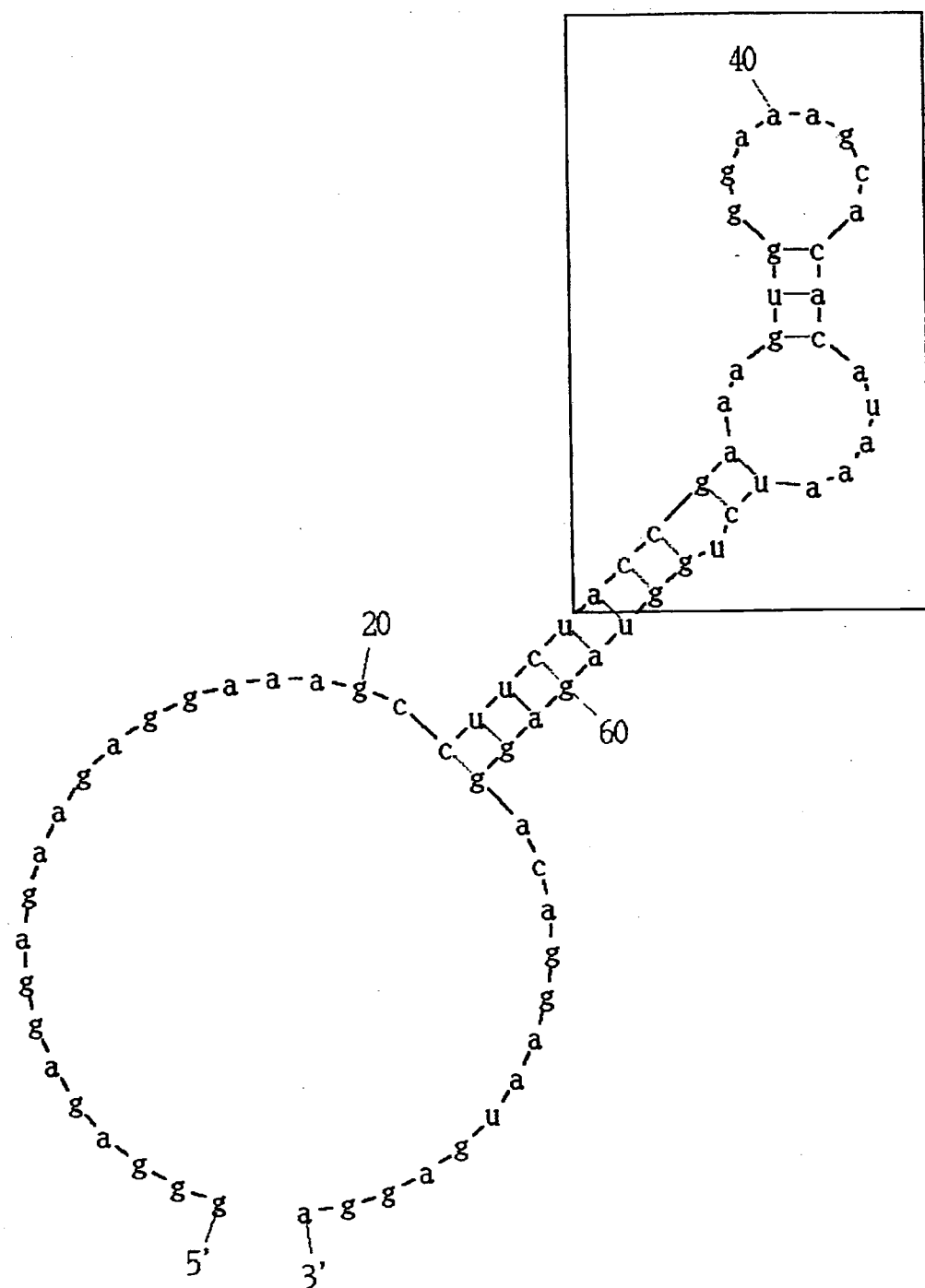


FIG. 3A



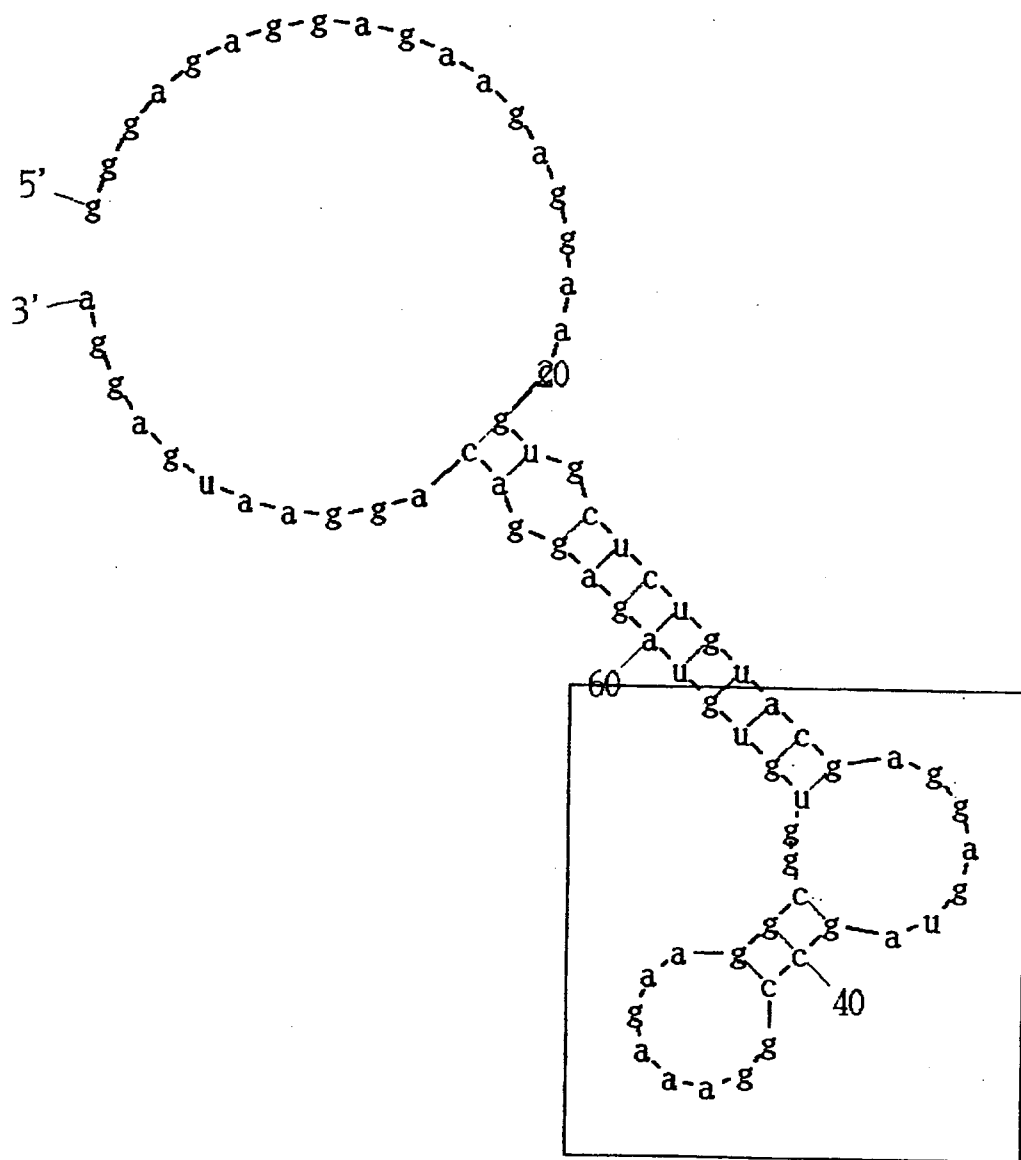
6/12

FIG. 3B



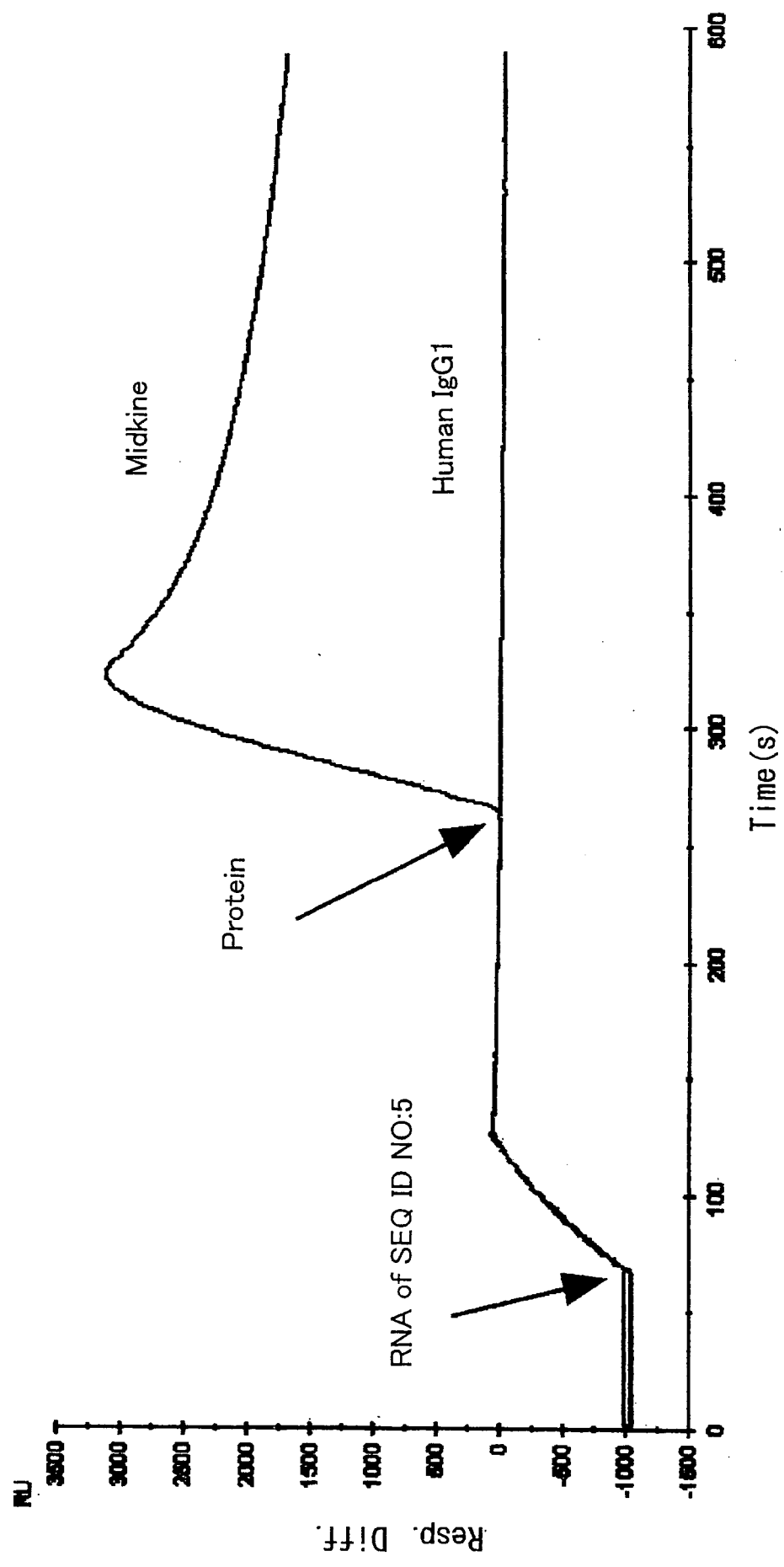
7/12

FIG. 4



9/12

FIG. 6



10/12

FIG. 7

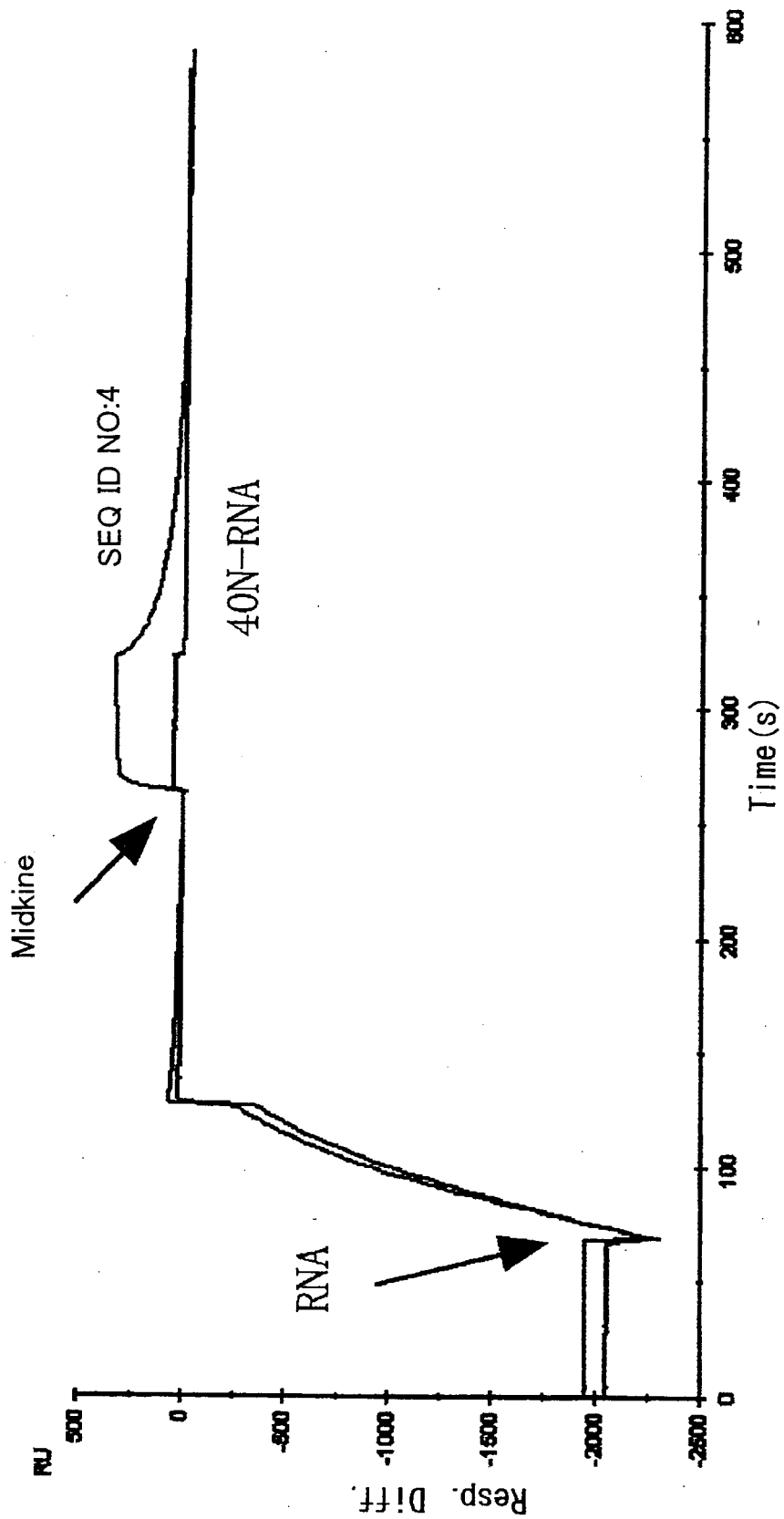
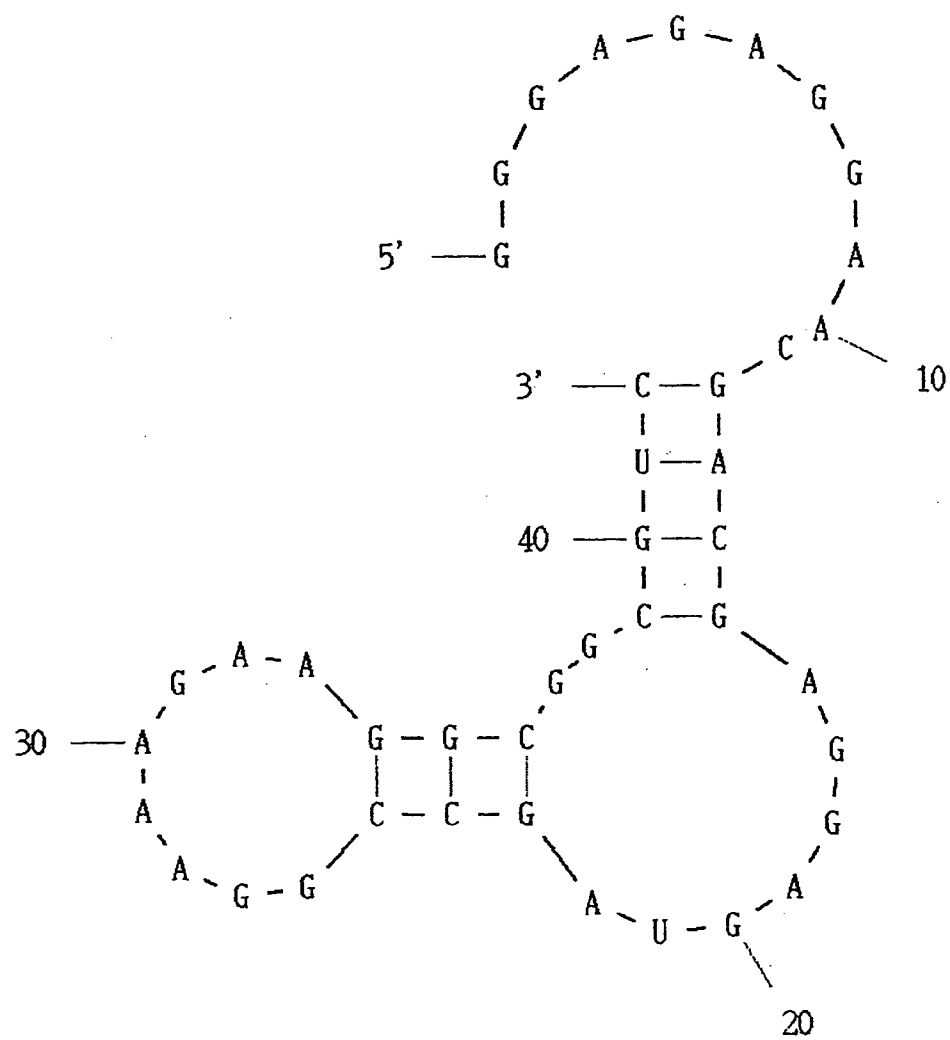
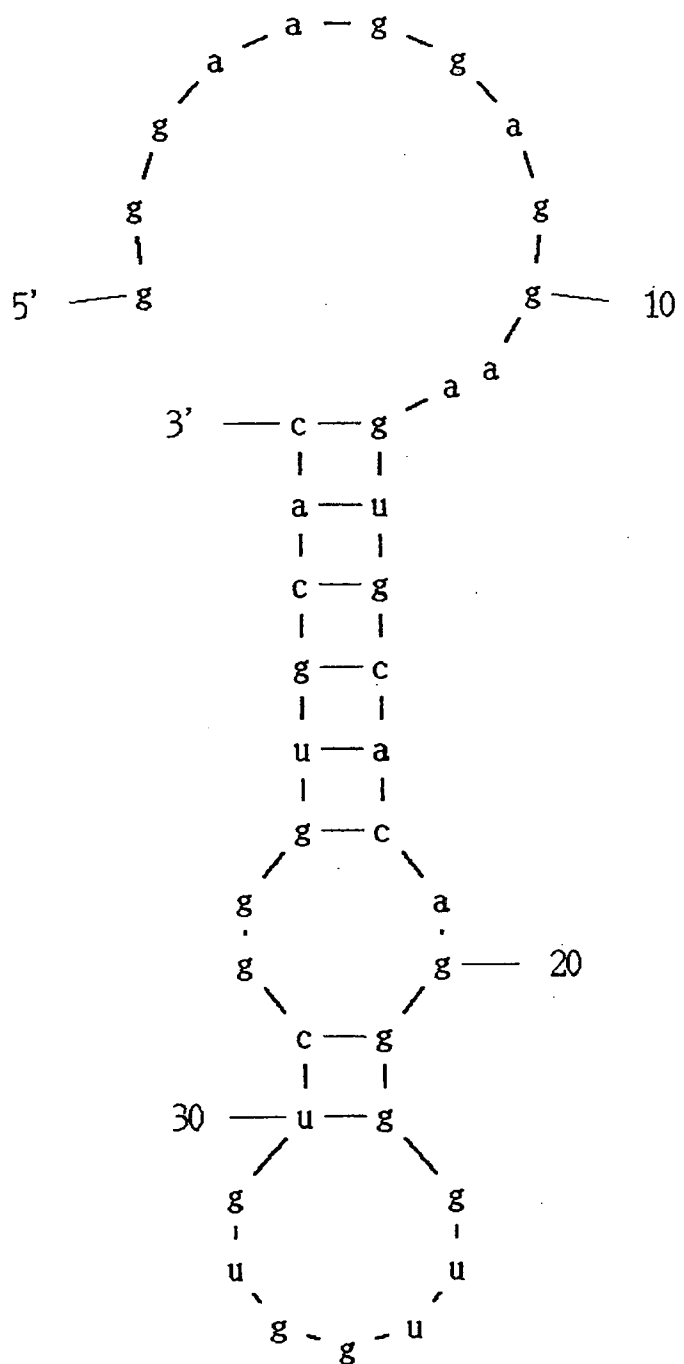


FIG. 8



12/12

FIG. 9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2007/072099

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12N15/09(2006.01)i, A61K38/00(2006.01)i, A61P9/00(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i, G01N33/566(2006.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N15/09, A61K38/00, A61P9/00, A61P35/00, A61P43/00, G01N33/53, G01N33/566 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JSTPlus (JDream2), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	INOH, K. et al., Doxorubicin-Conjugated Anti-Midkine Monoclonal Antibody as a Potential Anti-Tumor Drug, Japanese Journal of Clinical Oncology, 2006 Apr., Vol.36, No.4, p.207-211 page 209, left column, Par. No. [0002] to page 210, left column, Par. No. [0001], Fig. 4	1-16
Y	WO 2004/085642 A1 (MURAMATSU, T), 07 October, 2004 (07.10.04), Claims 12 to 16 (Family: none)	1-16
Y	WO 99/03493 A1 (MEIJI MILK PRODUCTS CO., LTD.), 28 January, 1999 (28.01.99), Claim 6; page 6, Par. No. [0002] & EP 0998941 A1 & US 2003/0072739 A1	1-16
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 04 December, 2007 (04.12.07)		Date of mailing of the international search report 18 December, 2007 (18.12.07)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2007/072099

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2004-344008 A (Giichi NAKAMURA et al.), 09 December, 2004 (09.12.04), Par. Nos. [0061] to [0072] (Family: none)	1-16
Y	JP 2006-141305 A (The University of Tokyo), 08 June, 2006 (08.06.06), Par. Nos. [0010], [0011], [0046] to [0072] (Family: none)	1-16
Y	JP 2006-211905 A (The University of Tokyo), 17 August, 2006 (17.08.06), Par. Nos. [0045] to [0058] (Family: none)	1-16
A	JP 2000-354487 A (Takashi MURAMATSU et al.), 26 December, 2000 (26.12.00), Par. No. [0006] (Family: none)	1-16
A	IWASAKI, W., et al., Solution structure of midkine, a new heparin-binding growth factor, The EMBO Journal, 1997, Vol.16, No.23, p.6936-6946, full text	1-16

**PCT**NOTIFICATION CONCERNING
SUBMISSION OR TRANSMITTAL
OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

TAKASHIMA, Hajime
Meiji Yasuda Seimei Osaka Midosuji Bldg.
1-1, Fushimimachi 4-chome, Chuo-ku
Osaka-shi, Osaka 5410044
JAPON

Date of mailing (day/month/year) 10 January 2008 (10.01.2008)	
Applicant's or agent's file reference 091160	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/JP2007/072099	International filing date (day/month/year) 14 November 2007 (14.11.2007)
International publication date (day/month/year) Not yet published	Priority date (day/month/year) 14 November 2006 (14.11.2006)
Applicant RIBOMIC INC. 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 OfficeDate of receipt
of priority document

14 November 2006 (14.11.2006) /

2006-308482 /

JP /

03 January 2008 (03.01.2008)

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Authorized officer

Masashi Honda

Facsimile No. +41 22 338 82 70

e-mail PT08.PCT@WIPO.INT

Telephone No. +41 22 338 74 08

APTAMERO CONTRA MIDCINA, Y USO DEL MISMO

CAMPO TECNICO

5 La presente invención se refiere a un aptámero contra midcina, un método de uso del mismo, y similares.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 Midcina (abreviada en lo sucesivo como "MK", según se requiera), es un factor de crecimiento/diferenciación que fue descubierto por vez primera como un producto génico expresado transitoriamente en el proceso de inducción de diferenciación de células tumorales embrionarias (EC) con ácido retinoico, siendo un polipéptido que tiene un peso molecular de 13 kDa, rico en aminoácidos básicos y
15 cisteína (véase, por ejemplo, el documento no de patente 1 y el documento no de patente 2).

 La estructura estérica de MK se ha determinado por RMN, y se ha reportado (véase, por ejemplo, el documento no de patente 3). Cuando se caracteriza estructuralmente, MK es configurada principalmente con dos dominios.
20 Específicamente, MK consiste de un fragmento en el lado N-terminal que consiste de los residuos de aminoácido 1 a 52 (referido en lo sucesivo como "el fragmento N-terminal"), un fragmento en el lado C-terminal que consiste de los residuos de aminoácido 62 a 121 (referido en lo sucesivo como "el fragmento C-terminal"), y una región de espira que une a los fragmentos (residuos de aminoácido 53 a 61). Unida al
25 exterior de cada dominio, está una cola que es rica en aminoácidos básicos. En la molécula de MK, cada uno del fragmento N-terminal y el fragmento C-terminal tiene una estructura estérica que consiste principalmente de tres estructuras de lámina β

invertidas (referidas en lo sucesivo como “dominios”; un dominio que consiste de los
residuos de aminoácido 15 a 52 en el fragmento N-terminal referido como “el dominio
N”, un dominio que consiste de los residuos de aminoácido 62 a 104 en el fragmento C-
terminal referido como “el dominio C”), y estructuras libremente móviles que no asumen
5 estructura particular alguna (referidas en lo sucesivo como “colas”; una cola que
consiste de los residuos de aminoácido 1 a 14 en el fragmento N-terminal referida como
“la cola N”, y una cola que consiste de los residuos de aminoácido 105 a 121 en el
fragmento C-terminal referida como “la cola C”).

Receptores conocidos de MK incluyen proteína tirosina fosfatasa □ tipo
10 receptor (PTP□), LRP (proteína relacionada con el receptor de lipoproteína de baja
densidad), ALK (cinasa de leucemia anaplásica), integrina y sindecan, y similares. MK
es una proteína altamente cargada positivamente que contiene grandes cantidades de
los aminoácidos básicos lisina (K) y arginina (R). Tiene un sitio de unión a heparina en
el dominio C de la misma, y es conocida por unirse fuertemente a moléculas cargadas
15 negativamente, tales como la heparina y el sulfato de condroitina E. Como resultado del
análisis de mutagénesis y análisis por RMN, se piensa que el grupo I, configurado con
K79, R81 y K102, y el grupo II, configurado con K86, K87 y R89, son importantes para
la unión con la heparina. Mientras tanto, está disponible un reporte de que sólo el grupo
I es importante para la unión con el sulfato de condroitina E. Cuando R81 del grupo I es
20 reemplazado con A, la actividad de unión con la heparina disminuye. Como resultado, la
reducción de la actividad de unión a PTP□ y el alargamiento de neuritas inducido por
MK y el movimiento de células nerviosas, son suprimidos.

Algunos factores de crecimiento tales como el factor de crecimiento de
fibroblastos (bFGF) y el factor de crecimiento de células endoteliales vasculares
25 (VEGF), tienen un sitio de unión a heparina. Se piensa que estos factores de
crecimiento se unen al proteoglucano sulfato de heparitina, una matriz extracelular, se
mantienen en posiciones adecuadas, y son liberados, según se requiera. Los mismos

son conocidos también por unirse al sulfato de heparitina expresado en células nerviosas y células endoteliales vasculares que contribuyen al alargamiento de las neuritas y el aumento de la actividad fibrinolítica. Cuando una caja de Petri es recubierta con MK, y células nerviosas de embrión de ratón se siembran sobre la misma, las neuritas se alargan. En esta situación, la digestión de las células nerviosas con heparitinasa suprime el alargamiento de las neuritas. Mientras tanto, cuando se cultivan células endoteliales vasculares y se añade MK, la actividad del activador de plasminógeno de las células aumenta. En este caso también, la digestión de las células con heparitinasa suprime el aumento de la actividad del plasminógeno.

Se piensa que MK se une con PTP $\square$ en dos sitios. Un sitio implica un enlace de alta afinidad con sulfato de condroitina ($K_d = 0.58$ nM). Este enlace desaparece tras la digestión con condroitinasa. El otro sitio implica un enlace con proteína, siendo un enlace de baja afinidad que se mantiene después de la digestión con condroitinasa ($K_d = 3$ nM). MK promueve la migración de células nerviosas fetales que expresan PTP $\square$; el tratamiento de las células nerviosas con condroitinasa ABC, suprime la migración. Células UMR106 tipo osteoblasto expresan PTP $\square$, y son conocidas por tener la migración de las mismas dependiente de MK suprimida por el tratamiento con condroitinasa ABC. La migración de macrófagos dependiente de MK es suprimida también por el tratamiento con condroitinasa ABC, condroitinasa B o heparinasa. Debido a que se piensa que los macrófagos no expresan PTP $\square$, se piensa que está implicado otro receptor.

Cualquiera cargado negativamente no se une al sitio de unión a heparina de MK. Cuando MK fue inmovilizada por aminoacoplamiento y sometida a análisis de resonancia de plasmones de superficie, los resultados obtenidos mostraron que el sulfato de condroitina E y la heparina se unieron fuertemente a MK, mientras que el sulfato de condroitina A, B, C y D no se unió a la misma.

MK es conocida por poseer una amplia gama de actividades biológicas.

Por ejemplo, se sabe que en células cancerosas humanas, la expresión de MK se incrementa. Esta expresión incrementada se ha observado en una amplia variedad de cánceres, que incluyen cáncer esofágico, cáncer de tiroides, cáncer de vejiga urinaria, cáncer colorrectal, cáncer gástrico, cáncer pancreático, cáncer de tórax, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, cáncer de mama, neuroblastoma, glioblastoma, cáncer uterino, cáncer ovárico y tumor de Wilms (véase, por ejemplo, el documento de patente 1 y el documento no de patente 4). Se piensa también que MK promueve la supervivencia y el movimiento de células cancerosas, y facilita la neovascularización que ayuda al avance del cáncer.

MK es conocida también por ser una de las moléculas que desempeña la función central en el proceso de desarrollo de inflamación. Por ejemplo, se sabe que la formación de la íntima naciente después del daño a vasos sanguíneos y el inicio de nefritis en lesión isquémica, son mitigados en ratones con expresión bloqueada que carecen del gen de MK. Se sabe también que en un modelo de reumatismo, la adherencia postoperatoria es también considerablemente mitigada en ratones con expresión bloqueada de MK (véase, por ejemplo, el documento de patente 2, el documento de patente 3 y el documento de patente 4). Por lo tanto, MK es conocida por estar implicada en enfermedades inflamatorias tales como artritis, enfermedad autoinmune, artritis reumática (artritis reumatoide (RA), osteoartritis (OA)), esclerosis múltiple, adherencia postoperatoria, colitis inflamatoria, psoriasis, lupus, asma y anormalidades funcionales de neutrófilos. Además, MK es conocida por promover el movimiento (migración) de células inflamatorias tales como macrófagos y neutrófilos. Debido a que este movimiento se requiere para el desarrollo de inflamación, se piensa que cuando falta medicina, es improbable que ocurran enfermedades basadas en inflamación (véase, por ejemplo, el documento de patente 5).

Puesto que los niveles de MK se incrementan en el fluido peritoneal de mujeres con endometriosis avanzada, y también puesto que MK estimula la

proliferación de células intersticiales endometriales cultivadas, MK es conocida por estar implicada en el inicio y progresión de endometriosis (véase, por ejemplo, el documento de patente 6).

Además, exhibiendo acción de engrosamiento de la íntima vascular, MK es conocida por estar implicada en enfermedades obstructivas vasculares tales como restenosis consecutiva a cirugía de reconstrucción vascular, enfermedad obstructiva vascular arterial coronaria cardíaca, enfermedad obstructiva vascular cerebral, enfermedad obstructiva vascular renal, enfermedad obstructiva vascular periférica, arteriosclerosis e infarto cerebral (véase, por ejemplo, el documento de patente 2).

La migración celular es conocida por ser importante para los mecanismos para la infiltración/metástasis de células cancerosas, engrosamiento de la íntima y focos arterioscleróticos, neovascularización, y similares. Se sabe también que la migración de células inflamatorias está asociada profundamente con enfermedades cardiovasculares tales como angina de pecho, infarto al miocardio, infarto cerebral, hemorragia cerebral e hipertensión.

La pleiotrofina (PTN o HB-GAM) es la única proteína de la familia de la MK, teniendo aproximadamente 50% de homología con MK. Tanto MK como PTN son proteínas que contienen grandes cantidades de cisteína y residuos básicos. Los 10 residuos de cisteína están conservados en MK y PTN, y estructuralmente, pueden dividirse en el dominio N y el dominio C. Como resultado del análisis por RMN, se sabe que estas dos moléculas tienen estructuras tridimensionales muy similares. Cada dominio consiste de tres láminas β , unidas por medio de una región de enlace flexible. K79, R81 y K102, considerados por ser importantes para la unión con el sulfato de condroitina y la heparina, están conservados entre las dos proteínas. K79 y R81 están presentes en la misma lámina β , mientras que K102 está presente en la otra lámina β . Cuando MK y PTN forman una estructura estérica, estos residuos básicos aparecen en la vecindad de la superficie de la proteína.

En años recientes, las aplicaciones de aptámeros de ARN a fármacos terapéuticos, reactivos de diagnóstico y reactivos de prueba, han estado llamando la atención; algunos aptámeros de ARN han estado ya en etapa clínica o en etapa práctica. En diciembre de 2004, el primer fármaco de aptámero de ARN del mundo, Macugen, fue aprobado como un fármaco terapéutico para la degeneración macular relacionada con la edad en los Estados Unidos. Un aptámero de ARN se refiere a un ARN que se une específicamente a una sustancia objetivo tal como una proteína, y puede prepararse usando el método SELEX (evolución sistemática de ligandos por enriquecimiento exponencial) (véase los documentos no de patente 5 y 6). El método SELEX es un método por el cual un ARN que se une específicamente a una sustancia objetivo se selecciona de aproximadamente 10^{14} grupos de ARN que tienen diferentes secuencias de nucleótidos. El ARN usado tiene una estructura en donde una secuencia aleatoria de aproximadamente 40 residuos es intercalada por secuencias de iniciador. Se deja que estos grupos de ARN se asocien con una sustancia objetivo, y sólo el ARN que se haya unido a la sustancia objetivo se recupera usando un filtro, y similares. El ARN recuperado se amplifica por RT-PCR, y éste se usa como el molde para la siguiente ronda. Mediante la repetición de esta operación aproximadamente 10 veces, un aptámero de ARN que se une específicamente a la sustancia objetivo puede adquirirse a veces.

[Documento de patente 1] JP-A-6-172218

[Documento de patente 2] WO2000/10608

[Documento de patente 3] WO2004/078210

[Documento de patente 4] WO2004/085642

[Documento de patente 5] WO1999/03493

[Documento de patente 6] WO2006/016571.

[Documento no de patente 1] Kadomatsu, K. *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., 151: p. 1312-1318

[Documento no de patente 2] Tomokura, M. *et al.*, J. Biol. Chem, 265: p. 10765-10770

[Documento no de patente 3] Iwasaki, W. *et al.* (1997), EMBO J. 16, p. 6936-6946

[Documento no de patente 4] Muramatsu, T. (2002), J. Biochem. 132, p. 359-371

[Documento no de patente 5] Ellington *et al.* (1990), Nature, 346, 818-822

[Documento no de patente 6] Tuerk *et al.* (1990), Science, 249, 505-510.

BREVE DESCRIPCION DE LA INVENCION

Problemas que se resolverán mediante la invención

La presente invención está dirigida a proveer un aptámero para midcina, y un método para el uso del mismo, y similares.

Medios para resolver los problemas

Los presentes inventores investigaron diligentemente resolver el problema descrito anteriormente y, como resultado, tuvieron éxito en preparar un aptámero de buena calidad para midcina, lo cual resultó en la culminación de la presente invención.

Por consiguiente, la presente invención provee lo siguiente:

- 1.- Un aptámero que posee una actividad inhibidora contra midcina.
- 2.- El aptámero de 1, en donde el aptámero no posee una actividad inhibidora contra pleiotrofina.
- 3.- El aptámero de 1, que posee una actividad de unión al fragmento N-terminal de midcina.
- 4.- El aptámero de 1, que posee una actividad de unión al fragmento C-terminal de midcina.

5.- El aptámero de 2, que posee una actividad de unión al fragmento N-terminal de midcina.

6.- El aptámero de 2, que posee una actividad de unión al fragmento C-terminal de midcina.

5 7.- Un aptámero que exhibe una actividad inhibidora contra midcina, inhibiendo la unión de midcina y PTP□.

8.- El aptámero de 1, que es cualquiera de los incisos (a) o (b) siguientes:

10 (a) un aptámero que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada de entre SEQ ID NO: 1 a 70 (con la condición de que el uracilo pueda ser timina), en donde los nucleótidos contenidos en el aptámero son tales que,

 (i) las posiciones 2' de los nucleótidos de pirimidina, ya sea idénticos o diferentes, son átomos de flúor o sustituidos por átomos o grupos seleccionados del grupo que consiste de átomos de hidrógeno, grupos hidroxil y grupos metoxil, y

15 (ii) las posiciones 2' de los nucleótidos de purina, ya sea idénticos o diferentes, son grupos hidroxil o sustituidos por átomos o grupos seleccionados del grupo que consiste de átomos de hidrógeno, grupos metoxil y átomos de flúor;

 (b) un aptámero que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada de entre SEQ ID NO: 1 a 70 (con la condición de que el uracilo pueda ser timina), en donde uno o varios nucleótidos son sustituidos, deletados, insertados o
20 añadidos, en donde los nucleótidos contenidos en el aptámero son tales que,

 (i) las posiciones 2' de los nucleótidos de pirimidina, ya sea idénticos o diferentes, son átomos de flúor o sustituidos por átomos o grupos seleccionados del grupo que consiste de átomos de hidrógeno, grupos hidroxil y grupos metoxil, y

25 (ii) las posiciones 2' de los nucleótidos de purina, ya sea idénticos o diferentes, son grupos hidroxil o sustituidos por átomos o grupos seleccionados del grupo que consiste de átomos de hidrógeno, grupos metoxil y átomos de flúor.

9.- El aptámero de cualquiera de 1 a 8, en donde un nucleótido contenido

en el aptámero es modificado.

10.- Un complejo que comprende el aptámero de cualquiera de 1 a 9 y una sustancia funcional.

11.- El complejo de 10, en donde la sustancia funcional es una sustancia de afinidad, una sustancia para marcación, una enzima, un vehículo de suministro de fármacos o un fármaco.

12.- Un fármaco farmacéutico que comprende el aptámero de cualquiera de 1 a 9, o el complejo de 10 u 11.

13.- Un inhibidor de migración celular que comprende el aptámero de cualquiera de 1 a 9 o el complejo de 10 u 11.

14.- Un reactivo de diagnóstico que comprende el aptámero de cualquiera de 1 a 9 o el complejo de 10 u 11.

15.- Un agente de marcación que comprende el aptámero de cualquiera de 1 a 9 o el complejo de 10 u 11.

16.- Un método para detectar el aptámero de cualquiera de 1 a 9 o el complejo de 10 u 11.

Efecto de la invención

El aptámero o el complejo de la presente invención, puede ser útil como fármacos farmacéuticos o reactivos tales como reactivos de diagnóstico, para varias enfermedades tales como enfermedad autoinmune, cáncer, adherencia postoperatoria y endometriosis. El aptámero o el complejo de la presente invención puede ser también útil para purificar y concentrar MK y detectar y cuantificar MK.

BREVE DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS

La figura 1A muestra una de las dos estructuras secundarias de ARN

mostradas por SEQ ID NO: 1 predicha por el programa MFOLD.

La figura 1B muestra la otra estructura secundaria de ARN mostrada por SEQ ID NO: 1 predicha por el programa MFOLD.

La figura 2A muestra una de las dos estructuras secundarias de ARN mostradas por SEQ ID NO: 2 predicha por el programa MFOLD, en donde la parte encerrada en un cuadro muestra una región consenso.

La figura 2B muestra la otra estructura secundaria de ARN mostrada por SEQ ID NO: 2 predicha por el programa MFOLD, en donde la parte encerrada en un cuadro muestra una región consenso.

La figura 3A muestra una de las dos estructuras secundarias de ARN mostradas por SEQ ID NO: 3 predicha por el programa MFOLD.

La figura 3B muestra la otra estructura secundaria de ARN mostrada por SEQ ID NO: 3 predicha por el programa MFOLD, en donde la parte encerrada en un cuadro muestra una región consenso.

La figura 4 muestra la estructura secundaria de ARN mostrada por SEQ ID NO: 4 predicha por el programa MFOLD, en donde la parte encerrada en un cuadro muestra una región consenso.

La figura 5 muestra la otra estructura secundaria de ARN mostrada por SEQ ID NO: 5 predicha por el programa MFOLD.

La figura 6 muestra interacciones entre el ARN mostradas por SEQ ID NO: 5 y la midcina, y entre el ARN y la IgG1 humana (sensorgrama obtenido usando BIAcore 2000).

La figura 7 muestra la interacción entre el ARN mostrada por SEQ ID NO: 4 y la midcina (sensorgrama obtenido usando BIAcore 2000).

La figura 8 muestra la estructura secundaria de ARN mostrada por SEQ ID NO: 20 predicha por el programa MFOLD.

La figura 9 muestra la estructura secundaria de ARN mostrada por SEQ ID

NO: 61 predicha por el programa MFOLD.

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

5 La presente invención provee un aptámero que posee una actividad de unión para midcina (MK). Los aptámeros de la presente invención son capaces de inhibir actividades de MK.

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

15 Una actividad inhibidora contra MK significa inhibición de cualquier actividad biológica de MK. Como ejemplos de las actividades biológicas de MK, pueden mencionarse actividades de migración para células (por ejemplo, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, células de músculo liso vascular, células tumorales, osteoblastos, células nerviosas y células progenitoras de los mismos) (Takada *et al.*, 1997, J. Biochem. 122, 453-458, Horiba *et al.*, 2000, J. Clin. Invest. 105, 489-495, 20 Maeda *et al.*, 1999, J. Biol. Chem. 274, 12474-12479, Qi *et al.*, 2001, J. Biol. Chem. 276, 15868-15875), actividades de promoción de diferenciación y proliferación para células (por ejemplo, células tumorales, fibroblastos, queratinocitos, células nerviosas, condrocitos y células progenitoras de los mismos) (Muramatsu y Muramatsu, 1991, Biochem. Biophys. Res. Commun. 177, 652-658, Muramatsu *et al.*, 1993, Dev. Biol. 25 159, 392-402, Takei *et al.*, 2001, Cancer Res. 61, 8486-8491), actividades inhibidoras contra la proliferación y funciones de células T reguladoras, actividades de promoción de alargamiento para neuritas de células nerviosas, actividades inhibidoras contra

apoptosis de células (por ejemplo, células tumorales, células nerviosas), actividades de inducción de neovascularización para células (por ejemplo, células tumorales), actividades de inducción de la formación de sinapsis para mioblastos, actividades de promoción del sistema fibrinolítico para células endoteliales vasculares, actividades de promoción de la producción de IL-8 para células de músculo liso vascular, y similares. Por lo tanto, como ejemplos de actividades inhibitoras contra MK, pueden mencionarse actividades inhibitoras contra estas actividades.

El aptámero de la presente invención puede poseer actividades inhibitoras contra MK derivada de cualquier mamífero. Como ejemplos de dichos mamíferos, pueden mencionarse primates (por ejemplo, humanos, monos), roedores (por ejemplo, ratones, ratas, conejillos de Indias), así como animales de compañía, animales domesticados y animales de trabajo (por ejemplo, perros, gatos, caballos, bovinos, cabras, ovejas, cerdos).

Los aptámeros de la presente invención no son particularmente limitados, mientras sean capaces de mostrar unión a una porción opcionalmente elegida de MK que inhiba una actividad de la misma; por ejemplo, por unión al fragmento N-terminal o fragmento C-terminal de MK, los aptámeros de la presente invención son capaces de inhibir actividades de MK. La secuencia de aminoácidos de la MK humana es mostrada por el número de acceso del GenBank BC011704, la proteína secretoria siendo configurada con 121 residuos de aminoácido de la lisina 23 al ácido aspártico 143. En general, el residuo de lisina 23 es denotado por el residuo de aminoácido en la posición 1. La MK humana consiste de un fragmento N-terminal que consiste de los residuos de aminoácido 1 a 52, un fragmento C-terminal que consiste de los residuos de aminoácido 62 a 121, y una región de espira que une los fragmentos, pero el límite del fragmento N-terminal y el fragmento C-terminal puede ser cualquier porción de espira de MK (53-61), y no puede definirse con precisión.

La longitud del aptámero de la presente invención no es limitado, y puede

ser usualmente de aproximadamente 15 a aproximadamente 200 nucleótidos, y puede ser, por ejemplo, no mayor de aproximadamente 100 nucleótidos, de preferencia no mayor de aproximadamente 80 nucleótidos, más preferiblemente no mayor de aproximadamente 60 nucleótidos, muy preferiblemente no mayor de aproximadamente 45 nucleótidos. La longitud del aptámero de la presente invención puede ser, por ejemplo, no menor de aproximadamente 18, 20 ó 25 nucleótidos. Si el número total de nucleótidos es más pequeño, la síntesis química y la producción en masa serán más fáciles de lograr, y existe una ventaja principal en términos de costo. Se piensa también que la modificación química es fácil, la estabilidad en el cuerpo es alta, y la toxicidad es baja.

Cada uno de los nucleótidos contenidos en el aptámero de la presente invención, ya sea idénticos o diferentes, puede ser un nucleótido que comprenda un grupo hidroxilo en la posición 2' de la ribosa (por ejemplo, ribosa de nucleótido de pirimidina) (es decir, un nucleótido no sustituido), o un nucleótido que tenga el grupo hidroxilo sustituido por un átomo o grupo opcionalmente elegido en la posición 2' de la ribosa. Como ejemplos de dicho átomo o grupo opcionalmente elegido, puede mencionarse un nucleótido sustituido por un átomo de hidrógeno, un átomo de flúor o un grupo -O-alquilo (por ejemplo, grupo -O-Me), un grupo -O-acilo (por ejemplo, grupo -O-CHO) o un grupo amino (por ejemplo, grupo -NH₂). El aptámero de la presente invención puede ser también uno en donde por lo menos un tipo (por ejemplo, 1, 2, 3 ó 4 tipos) de nucleótido comprenda un nucleótido que comprende un grupo hidroxilo, o el átomo o grupo opcionalmente elegido descrito anteriormente, por ejemplo, por lo menos dos tipos (por ejemplo, 2, 3 ó 4 tipos) de grupos seleccionados del grupo que consiste de un átomo de hidrógeno, un átomo de flúor, un grupo hidroxilo, un grupo -O-Me, en la posición 2' de la ribosa. En los aptámeros de la presente invención, todos los nucleótidos pueden ser nucleótidos que comprenden un grupo hidroxilo, o un átomo o grupo opcionalmente elegido descrito anteriormente, por ejemplo, un grupo

seleccionado del grupo que consiste de un átomo de hidrógeno, un átomo de flúor, un grupo hidroxilo y un grupo -O-Me, en la posición 2' de la ribosa.

Un ejemplo de un aptámero de la presente invención puede tener una estructura secundaria potencial que comprenda una o más regiones seleccionadas del grupo que consiste de regiones de cadena sencilla (por ejemplo, gggagaggaac),
5 regiones del primer tallo (por ejemplo, gacg y cadenas complementarias de la misma), regiones de espira internas (por ejemplo, aggagua y gg), regiones del segundo tallo (por ejemplo, gcc y cadenas complementarias de la misma), y regiones de espira internas (por ejemplo, ggaaagaa). Otro ejemplo de un aptámero de la presente invención puede
10 tener una estructura secundaria potencial que comprenda una o más regiones seleccionadas del grupo que consiste de regiones de cadena sencilla (por ejemplo, gggaaggaggaa), regiones del primer tallo (por ejemplo, gugcac y cadenas complementarias de la misma), regiones de espira internas (por ejemplo, ag y gg), regiones del segundo tallo (por ejemplo, gg y cadenas complementarias de la misma), y
15 regiones de espira internas (por ejemplo, guuggug).

Como se usa en la presente, el término "estructura secundaria potencial" se refiere a una estructura secundaria capaz de ocurrir establemente bajo condiciones fisiológicas; por ejemplo, si o no una estructura secundaria potencial está presente, puede determinarse usando los programas de predicción de estructura descritos en los
20 ejemplos. Una región de tallo se refiere a una porción en donde una doble cadena es formada por un par de bases en dos o más nucleótidos continuos (por ejemplo, G-C, A-U, A-T). Una porción de espira interna se refiere a una región no de tallo formada entre dos regiones de tallo diferentes. Una región de espira de la horquilla se refiere a una estructura parcial formada por una región de tallo, siendo una región de espira formada
25 en el lado opuesto al extremo 5' y extremo 3' de una cadena del aptámero. Una región de cadena sencilla se refiere a una porción terminal de una cadena de polinucleótidos, siendo una región que no corresponde a la región de tallo, región de espira interna o

región de espira de la horquilla descrita anteriormente.

Los aptámeros de la presente invención pueden tener también la capacidad de mostrar unión al fragmento N-terminal y/o el fragmento C-terminal de MK. El aptámero mostrado por SEQ ID NO: 39 y formas alteradas del mismo, al igual que la heparina y el sulfato de condroitina E, exhiben alta actividad de unión para el fragmento C-terminal. Se piensa que la heparina se une al fragmento C-terminal en las regiones del grupo I y grupo II. Se piensa que el sulfato de condroitina E se une al fragmento C-terminal en la región del grupo I. Se sabe que MK interactúa con PTP α , que comprende sulfato de condroitina como una molécula constituyente de la misma. PTP α es expresada en células nerviosas fetales y células tipo osteoblasto, y en presencia de MK, la migración de estas células es promovida. En la presente invención, se provee un aptámero capaz de mostrar unión al fragmento C-terminal que inhibe la migración celular, y un aptámero que se une principalmente al fragmento N-terminal que inhibe la migración celular.

Los aptámeros de la presente invención son también capaces de inhibir actividades de MK (por ejemplo, actividad de migración celular de MK), y pueden tener el rasgo de ser inestables para inhibir una actividad de PTN (por ejemplo, actividad de migración celular de PTN). PTN es la única proteína de la familia de MK que tiene una homología de 50%, tienen estructuras tridimensionales muy similares, y los residuos de aminoácido importantes para la unión con el sulfato de condroitina y la heparina están conservados.

El aptámero de la presente invención puede ser también (a) un aptámero que comprenda una secuencia de nucleótidos seleccionada de una de SEQ ID NO: 1 a 70 (pero el uracilo puede ser timina), (b) un aptámero que comprenda una secuencia de nucleótidos seleccionada de una de SEQ ID NO: 1 a 70 (pero el uracilo puede ser timina) teniendo uno o más nucleótidos sustituidos, deletados, insertados o añadidos, o (c) un conjugado seleccionado del grupo que consiste de un conjugado de una

pluralidad de unidades del inciso (a) anterior, un conjugado de una pluralidad de unidades del inciso (b) anterior, y un conjugado de una pluralidad de unidades de los incisos (a) y (b) anteriores. En el inciso (b) anterior, el número de nucleótidos sustituidos, deletados, insertados o añadidos no es particularmente limitado, en tanto sean varios de ellos, y el número de nucleótidos puede ser, por ejemplo, no mayor de aproximadamente 30, de preferencia no mayor de aproximadamente 20, más preferiblemente no mayor de aproximadamente 10, aún más preferiblemente no mayor de 5, y muy preferiblemente 4, 3, 2 ó 1. En el inciso (c) anterior, la conjugación puede lograrse por unión en tándem. En la conjugación, puede usarse un enlazador. Como el enlazador, pueden mencionarse cadenas de nucleótidos (por ejemplo, 1 a aproximadamente 20 nucleótidos) y cadenas no de nucleótidos (por ejemplo, enlazador de $-(CH_2)_n-$, enlazador de $-(CH_2CH_2O)_n-$, enlazador de hexaetilenglicol, enlazador de TEG, enlazador que contenga péptidos, enlazador que contenga enlaces de $-S-S-$, enlazador que contenga enlaces de $-CONH-$, enlazador que contenga enlaces de $-OPO_3-$). La pluralidad como se mencionó en la pluralidad de conjugados descrita anteriormente no es particularmente limitada, en tanto sea de dos o más, y la pluralidad puede ser, por ejemplo, de 2, 3 ó 4. Cada uno de los nucleótidos en los incisos (a) a (c) anteriores, ya sea idénticos o diferentes, puede ser un nucleótido que comprenda un grupo hidroxilo en la posición 2' de la ribosa, o un nucleótido que tenga el grupo hidroxilo sustituido por un grupo opcionalmente elegido (por ejemplo, átomo de hidrógeno, átomo de flúor o grupo $-O-Me$) en la posición 2' de la ribosa (por ejemplo, ribosa del nucleótido de pirimidina).

En un aspecto particular, los aptámeros de la presente invención se clasifican aproximadamente en tres tipos de acuerdo a las estructuras de los mismos.

Un primer aptámero es un aptámero que consiste de la secuencia de nucleótidos mostrada por SEQ ID NO: 61, o un mutante de la misma. Un aptámero que consiste de la secuencia de nucleótidos mostrada por SEQ ID NO: 61, cuando la estructura

secundaria de la misma es predicha por el programa MFOLD, tiene la estructura secundaria potencial mostrada en la figura 9, siendo configurada con una región de cadena sencilla, una región del primer tallo, una región de espira interna, una región del segundo tallo, y una región de espira de la horquilla. En este aptámero, la sustitución, 5
delección, inserción y/o adición de varios nucleótidos son aceptables en la región de cadena sencilla, región del primer tallo, región de espira interna, región del segundo tallo y región de espira de la horquilla. Por ejemplo, en este aptámero, la inserción de varios nucleótidos en la región de cadena sencilla, la inserción de varios nucleótidos en la región del primer tallo y la adición de varios nucleótidos a la región de cadena sencilla 10
del extremo 3' (por ejemplo, SEQ ID NO: 5), son aceptables. Dicho aptámero se une más fuertemente al fragmento N-terminal que al fragmento C-terminal de MK.

Un segundo aptámero es un aptámero que consiste de la secuencia de nucleótidos mostrada por SEQ ID NO: 20, o un mutante de la misma. Un aptámero que consiste de la secuencia de nucleótidos mostrada por SEQ ID NO: 20, la estructura 15
secundaria predicha por el programa MFOLD, tiene la estructura secundaria potencial mostrada en la figura 8, siendo configurada con una región de cadena sencilla, una región del primer tallo, una región de espira interna, una región del segundo tallo y una región de espira de la horquilla. En este aptámero, la sustitución, delección, inserción y/o adición de varios nucleótidos son aceptables en la región de cadena sencilla, región del 20
primer tallo, región de espira interna, región del segundo tallo y región de espira de la horquilla. Por ejemplo, en este aptámero, la adición de varios nucleótidos a la región de cadena sencilla, la región del primer tallo y/o el extremo 3' (por ejemplo, SEQ ID NO: 4), es aceptable. Dicho aptámero casi no exhibe afinidad por el fragmento N-terminal de MK, y se une fuertemente al fragmento C-terminal.

25 Un tercer aptámero puede ser un aptámero que consista de la secuencia de nucleótidos mostrada por SEQ ID NO: 1, o un mutante de la misma.

El aptámero de la presente invención puede ser uno en donde un residuo

de azúcar (por ejemplo, ribosa) de cada nucleótido haya sido modificado para incrementar la actividad de unión de MK, estabilidad, disponibilidad de fármacos, y similares. Como ejemplo del sitio que será modificado en un residuo de azúcar, puede mencionarse uno que tenga el átomo de oxígeno en la posición 2', posición 3' y/o posición 4' del residuo de azúcar reemplazado con otro átomo, y similares. Como ejemplos de la modificación, pueden mencionarse fluoración, O-alquilación (por ejemplo, O-metilación, O-etilación), O-arilación, S-alquilación (por ejemplo, S-metilación, S-etilación), S-arilación y aminación (por ejemplo, -NH₂). Dichas alteraciones en el residuo de azúcar pueden realizarse mediante un método conocido *per se* (véase, por ejemplo, Sproat *et al.* (1991), Nucl. Acid. Res. 19, 733-738; Cotton *et al.* (1991), Nucl. Acid. Res. 19, 2629-2635; y Hobbs *et al.* (1973), Biochemistry 12, 5138-5145).

El aptámero de la presente invención puede tener también una base de ácido nucleico (por ejemplo, purina o pirimidina) alterada (por ejemplo, por sustitución química) que incremente la actividad de unión de MK, y similares. Como ejemplos de dichas alteraciones, pueden mencionarse alteración de pirimidina en la posición 5, alteración de purina en la posición 6 y/o posición 8, alteración con una amina extracíclica, sustitución con 4-tiouridina, y sustitución con 5-bromo o 5-yodo-uracilo. El grupo fosfato contenido en el aptámero de la presente invención puede ser alterado para conferir resistencia a nucleasas e hidrólisis. Por ejemplo, el grupo P(O)O puede ser sustituido con P(O)S (tioato), P(S)S (ditioato), P(O)NR₂ (amidato), P(O)R, R(O)OR', CO o CH₂ (formacetal) o 3'-amina (-NH-CH₂-CH₂-) [en donde cada unidad de R o R' es independientemente H o un alquilo sustituido o no sustituido (por ejemplo, metilo, etilo)].

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

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

Una alteración puede realizarse además por adición a un extremo de un

polietilenglicol, aminoácido, péptido, dT invertida, ácido nucleico, nucleósidos, miristoilo, oleilo litocólico, docosanilo, lauroilo, estearoilo, palmitoilo, oleoilo, linoleoilo, otros lípidos, esteroides, colesterol, cafeína, vitaminas, pigmentos, sustancias fluorescentes, agente contra el cáncer, toxina, enzimas, sustancia radiactiva, biotina, y similares. Para
5 dichas alteraciones, véase, por ejemplo, las patentes de E.U.A. 5,660,985 y 5,756,703.

Los aptámeros de la presente invención pueden sintetizarse químicamente mediante descripciones en la presente, y un método conocido *per se* en la técnica. Un aptámero se une a la sustancia objetivo en una amplia variedad de modos de unión, tales como enlaces iónicos basados en la carga negativa del grupo fosfato, enlaces
10 hidrofóbicos y enlaces de hidrógeno basados en la ribosa, y enlaces de hidrógeno y enlaces de apilamiento basados en bases de ácidos nucleicos. En particular, los enlaces iónicos basados en la carga negativa del grupo fosfato, los cuales están presentes en el mismo número que el número de nucleótidos constituyentes, son fuertes, y se unen a la lisina y arginina que están presentes sobre la superficie de la
15 carga positiva de la proteína. Por esta razón, las bases de ácido nucleico no implicadas en la unión directa a la sustancia objetivo pueden ser sustituidas. En particular, debido a que la región de la estructura de tallo ya ha formado pares de bases y mira hacia el interior de la doble estructura helicoidal, es improbable que las bases de ácido nucleico se unan directamente a la sustancia objetivo. Por lo tanto, incluso cuando un par de
20 bases es reemplazado con otro par de bases, la actividad del aptámero con frecuencia no disminuye. En estructuras en donde no se forman pares de bases, tal como las estructuras de espira, siempre que la base de ácido nucleico no esté implicada en la unión directa a la molécula objetivo, la sustitución de bases es posible. Con respecto a modificaciones de la posición 2' de la ribosa, el grupo funcional en la posición 2' de la
25 ribosa interactúa rara vez directamente con la molécula objetivo, pero en muchos casos, carece de relevancia, y puede ser sustituido por otra molécula modificada. Por lo tanto, un aptámero, a menos que el grupo funcional implicado en la unión directa a la

molécula objetivo sea sustituido o deletado, retiene con frecuencia la actividad de la misma. También es importante que la estructura estérica general no cambie ampliamente.

Un aptámero puede prepararse usando el método SELEX o una versión
5 mejorada del mismo (véase, por ejemplo, Ellington *et al.* (1990), *Nature*, 346, 818-822; Tuerk *et al.* (1990), *Science*, 249, 505-510). En el método SELEX, mediante el aumento del número de rondas o usando una sustancia competente, un aptámero que exhiba una fuerza de unión más fuerte por la sustancia objetivo es concentrado y seleccionado. Por lo tanto, mediante el ajuste del número de rondas de SELEX, y/o cambiando la
10 condición competitiva, pueden obtenerse en algunos casos aptámeros con diferentes fuerzas de unión, aptámeros con diferentes modos de unión, y aptámeros con la misma fuerza de unión y mismo modo de unión, pero diferentes secuencias de bases. El método SELEX comprende un procedimiento de amplificación por PCR; mediante la generación de una mutación usando iones manganeso y similares en el procedimiento,
15 es posible realizar el método SELEX con mayor diversidad.

Los aptámeros obtenidos por el método SELEX son ácidos nucleicos que exhiben alta afinidad por la sustancia objetivo, y esto no significa la unión de los mismos al sitio activo de la sustancia objetivo. Por lo tanto, los aptámeros obtenidos por el método SELEX no siempre actúan sobre una función de la sustancia objetivo. MK tiene
20 una región rica en lisina en la región de la cola de cada uno del extremo N y el extremo C de la misma, a la cual se piensa que un ácido nucleico se une no específicamente. No se considera que esta porción de la cola es importante en la unión de la heparina o el sulfato de condroitina. No es fácil preparar un aptámero que inhiba efectivamente una actividad de MK en dicho ambiente. De hecho, en la presente invención, se examinaron
25 las actividades inhibitoras de la migración celular de 23 tipos de aptámeros, y sólo 4 tipos de aptámeros retuvieron no menos de 50% de actividad.

Pueden obtenerse los aptámeros seleccionados de esta manera con

actividad, que tengan desempeño incluso mayor realizando el método SELEX optimizado. El método SELEX optimizado se refiere a un método en el cual se realiza SELEX de nuevo después de preparar un molde en donde un aptámero con una cierta secuencia fija es cambiado parcialmente para incluir secuencias aleatorias o un molde
5 impurificado con aproximadamente 10 a 30% de secuencias aleatorias.

Un aptámero obtenido por el método SELEX tiene una longitud de aproximadamente 80 nucleótidos, y es difícil de preparar como un fármaco como está. Por lo tanto, es necesario repetir esfuerzos de ensayo y error para acortar el aptámero hasta una longitud de aproximadamente 50 nucleótidos o menos, permitiendo
10 una fácil síntesis química.

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

15 Los aptámeros son fácilmente alterables debido a que permiten la síntesis química. Para aptámeros, prediciendo la estructura secundaria usando el programa MFOLD, o prediciendo la estructura estérica por análisis por rayos X o análisis por RMN, es posible predecir hasta cierto grado qué nucleótido puede ser sustituido o deletado, y dónde insertar un nuevo nucleótido. Un aptámero con la nueva secuencia
20 predicha puede fácilmente sintetizarse químicamente, y puede determinarse si o no el aptámero retiene la actividad usando un sistema de prueba existente.

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

Las modificaciones, al igual que las secuencias, dan una amplia gama de

diseño o alteraciones.

Como se indicó anteriormente, los aptámeros permiten una amplia gama de diseño o alteraciones. La presente invención provee también un método de producción de aptámeros que permite una amplia gama de diseño o alteraciones de un aptámero que comprenda una secuencia especificada (por ejemplo, una secuencia que corresponda a una porción seleccionada de entre regiones de tallo, regiones de espira internas, regiones de espira de la horquilla y regiones de cadena sencilla: en lo sucesivo, abreviada como secuencia fija, según se requiera).

Por ejemplo, el método de producción de dicho aptámero incluye la producción de un aptámero que comprenda una secuencia fija usando un sólo tipo de molécula de ácido nucleico o una pluralidad de tipos de moléculas de ácido nucleico (por ejemplo, una colección de moléculas de ácido nucleico con diferentes números para "a" o "b") que consistan de una secuencia de nucleótidos mostrada por la fórmula:

Secuencia del iniciador (i) - (N) a- secuencia fija-(N)b - secuencia del iniciador

(ii) en donde (N)a representa una cadena de nucleótidos que consiste de "a" unidades de N; (N)b representa una cadena de nucleótidos que consiste de "b" unidades de N; cada una de las unidades de N, ya sea idénticas o diferentes, es un nucleótido seleccionado del grupo que consiste de A, G, C, U y T (de preferencia, A, G, C y U). Cada uno de "a" y "b", ya sean idénticos o diferentes, puede ser un número opcionalmente elegido y puede ser, por ejemplo, de 1 a aproximadamente 100, de preferencia de 1 a aproximadamente 50, más preferiblemente de 1 a aproximadamente 30, aún más preferiblemente de 1 a aproximadamente 20, o de 1 a aproximadamente 10], y pares de iniciadores que corresponden a las secuencias de iniciador (i) y (ii), respectivamente.

La presente invención provee también un complejo que comprende el aptámero de la presente invención y una sustancia funcional unida al mismo. El enlace entre el aptámero y la sustancia funcional en el complejo de la presente invención,

puede ser un enlace covalente o un enlace no covalente. El complejo de la presente invención puede ser uno en donde el aptámero de la presente invención y una o más (por ejemplo, 2 ó 3) de las sustancias funcionales del mismo tipo o de diferentes tipos son unidas entre sí. La sustancia funcional no es particularmente limitada, hasta que

5 confiera nuevamente una cierta función a un aptámero de la presente invención, o sea capaz de cambiar (por ejemplo, mejorar) una cierta característica que un aptámero de la presente invención puede poseer. Como ejemplos de la sustancia funcional, pueden mencionarse proteínas, péptidos, aminoácidos, lípidos, azúcares, monosacáridos, polinucleótidos y nucleótidos. Como ejemplos de la sustancia funcional, pueden

10 mencionarse sustancias de afinidad (por ejemplo, biotina, estreptavidina, polinucleótidos que posean afinidad por una secuencia complementaria objetivo, anticuerpos, glutatión, Sepharose, histidina), sustancias para marcación (por ejemplo, sustancias fluorescentes, sustancias luminiscentes, radioisótopos), enzimas (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina), vehículos de suministro de fármacos

15 (por ejemplo, liposomas, microesferas, péptidos, polietilenglicoles), fármacos (por ejemplo, aquellos usados en la terapia con proyectiles, tales como caliqueamicina y duocarmicina; análogos de mostaza de nitrógeno tales como ciclofosfamida, melfalán, ifosfamida, o trofosfamida; etileniminas tales como tiotepa; nitrosoureas tales como carmustina; agentes alquilantes tales como temozolomida o dacarbazina; antagonistas

20 metabólicos tipo folato tales como metotrexato o raltitrexed; análogos de purina tales como tioguanina, cladribina o fludarabina; análogos de pirimidina tales como fluorouracilo, tegafur o gemcitabina; alcaloides de vincapervinca tales como vinblastina, vincristina o vinorelbina, y análogos de los mismos; derivados de podofilotoxina tales como etopósido, taxanos, docetaxel o paclitaxel; antraciclina tales como doxorubicina,

25 epirubicina, idarrubicina y mitoxantrona, y análogos de los mismos; otros antibióticos citotóxicos tales como bleomicina y mitomicina; compuestos de platino tales como cisplatino, carboplatino y oxaliplatino; pentostatina, miltefosina, estramustina, topotecan,

irinotecan y bicalutamida) y toxinas (por ejemplo, toxina ricina, liatoxina y toxina Vero). Estas moléculas funcionales son finalmente removidas en algunos casos. Además, las moléculas pueden ser péptidos que pueden ser reconocidos y digeridos por enzimas tales como trombina, metaloproteasa de matriz (MMP) y factor X, o polinucleótidos que pueden ser digeridos por nucleasas o endonucleasas de restricción.

El aptámero o el complejo de la presente invención puede usarse, por ejemplo, como un fármaco o un reactivo (por ejemplo, reactivos de diagnóstico, reactivos de prueba (incluyendo reactivos experimentales)). Por ejemplo, los aptámeros o el complejo de la presente invención pueden usarse como inhibidores de la migración celular, promotores de la proliferación de células T reguladoras, promotores de la función supresora de células T reguladoras, supresores de inhibición de la apoptosis, inhibidores de la proliferación celular, inhibidores de la diferenciación celular, agentes de suministro de fármacos, sondas para la formación de imágenes *in vivo*, sondas para medir las concentraciones de MK en sangre, sondas para la tinción de tejidos, sondas para ELISA, y ligandos para la separación y purificación de MK.

Los aptámeros o el complejo de la presente invención pueden usarse también en la prevención o el tratamiento de varias enfermedades, tales como enfermedades autoinmunes (por ejemplo, esclerosis múltiple, lupus eritematoso sistémico (SLE), enfermedad de Sjögren, polimiositis (PM), dermatomiositis (DM), artritis reumática (artritis reumatoide (RA), osteoartritis (OA)), enteritis inflamatoria (enfermedad de Crohn, y similares), esclerosis sistémica progresiva (PSS), periarteritis nodosa (PN), enfermedades de la tiroides (enfermedad de Basedow, y similares), síndrome de Guillain-Barré, cirrosis biliar primaria (PBC), púrpura trombocitopénica idiopática, anemia hemolítica autoinmune, miastenia grave (MG), esclerosis lateral amiotrófica (ALS), diabetes tipo I, psoriasis, asma, anomalías funcionales de los neutrófilos), cánceres (por ejemplo, cáncer esofágico, cáncer de tiroides, cáncer de vejiga urinaria, cáncer colorrectal, cáncer gástrico, cáncer pancreático, cáncer de tórax,

cáncer de hígado, cáncer de pulmón, cáncer de mama, neuroblastoma, glioblastoma, cáncer uterino, cáncer ovárico, tumor de Wilms, cáncer prostático), adherencia post-operatoria, endometriosis, rechazos en trasplante, alergias, restenosis consecutiva a cirugía de reconstrucción vascular, enfermedad obstructiva vascular arterial coronaria
5 cardiaca, enfermedad obstructiva vascular cerebral, enfermedad obstructiva vascular renal, enfermedad obstructiva vascular periférica, arteriosclerosis e infarto cerebral. En particular, los aptámeros de la presente invención inhiben la actividad de migración celular de MK, y son por lo tanto útiles en la prevención o el tratamiento de esclerosis múltiple, adherencia post-operatoria, endometriosis, artritis reumatoide y estenosis
10 vascular.

El farmacéutico de la presente invención puede ser uno formulado con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Como ejemplos del vehículo farmacéuticamente aceptable, pueden mencionarse excipientes tales como sacarosa, almidón, manitol, sorbitol, lactosa, glucosa, celulosa, talco, fosfato de calcio y carbonato de calcio;
15 aglutinantes tales como celulosa, metilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, polipropilpirrolidona, gelatina, goma arábica, polietilenglicol, sacarosa y almidón; desintegradores tales como almidón, carboximetilcelulosa, hidroxipropilalmidón, almidón glicolato de sodio, carbonato ácido de sodio, fosfato de calcio y citrato de calcio; lubricantes tales como estearato de magnesio, Aerosil, talco y lauril sulfato de sodio;
20 agentes saborizantes tales como ácido cítrico, mentol, sal de amonio de glicirrizina, glicina y naranja en polvo; conservadores tales como benzoato de sodio, sulfito ácido de sodio, metilparabeno y propilparabeno; estabilizadores tales como ácido cítrico, citrato de sodio y ácido acético; agentes de suspensión tales como metilcelulosa, polivinilpirrolidona y estearato de aluminio; agentes de dispersión tales como agentes
25 tensoactivos; diluyentes tales como agua, solución salina fisiológica y jugo de naranja; ceras de base tales como manteca de cacao, polietilenglicol y queroseno; y similares, pero estos no son limitativos.

Preparaciones adecuadas para administración oral son una preparación líquida preparada disolviendo una cantidad efectiva de ligando en un diluyente tal como agua, solución salina fisiológica o jugo de naranja; cápsulas, sachets o tabletas que comprendan una cantidad efectiva de ligando en forma sólida o granular; una
5 suspensión preparada suspendiendo una cantidad efectiva de ingrediente activo en un dispersante adecuado; una emulsión preparada dispersando y emulsificando una solución de una cantidad efectiva de ingrediente activo en un dispersante adecuado, y similares.

El farmacéutico de la presente invención puede ser recubierto mediante un
10 método conocido *per se* para el propósito de enmascaramiento del sabor, disolución entérica, liberación sostenida, y similares, según se requiera. Como ejemplos de agentes de recubrimiento usados para el recubrimiento, se usan hidroxipropilmetilcelulosa, etilcelulosa, hidroximetilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, polioxietilenglicol, Tween 80, Pluronic F68, ftalato-acetato de celulosa, ftalato de
15 hidroxipropilmetilcelulosa, succinato-acetato de hidroximetilcelulosa, Eudragit (fabricado por Rohm, Alemania, copolímero de ácido metacrílico/ácido acrílico), pigmentos (por ejemplo, óxido de hierro rojo, dióxido de titanio, y similares), y similares. El farmacéutico puede ser una preparación de liberación rápida o una preparación de liberación sostenida. Como ejemplos de materiales de base de liberación sostenida, pueden
20 mencionarse liposoma, aterocolágena, gelatina, hidroxiapatita, PLGA, y similares.

Como preparaciones adecuadas para administración parenteral (por ejemplo, administración intravenosa, administración subcutánea, administración intramuscular, administración tópica, administración intraperitoneal, administración intranasal, administración pulmonar, y similares), están disponibles líquidos inyectables
25 estériles isotónicos acuosos y no acuosos, los cuales pueden comprender un antioxidante, una solución reguladora de pH, un agente bacteriostático, un agente de isotonización, y similares. Pueden mencionarse también suspensiones estériles

acuosas y no acuosas, las cuales pueden comprender un agente de suspensión, un solubilizador, un espesante, un estabilizador, un antiséptico, y similares. La preparación puede incluirse en un contenedor tal como una ampolleta o un vial en un volumen de dosificación unitario o en varias dosis divididas. Un ingrediente activo y un vehículo farmacéuticamente aceptable pueden ser también deshidratados por congelación (liofilizados) y almacenados en un estado que pueda ser disuelto o suspendido en un vehículo estéril adecuado poco antes de su uso. Además, aparte de líquidos inyectables, son también posibles inhalantes y ungüentos. En el caso de un inhalante, un ingrediente activo en un estado deshidratado por congelación es micronizado y administrado por inhalación usando un dispositivo de inhalación adecuado. Puede formularse un inhalante según sea adecuado con un agente tensoactivo, aceite, condimento, ciclodextrina o derivados de los mismos, y similares, usados convencionalmente, según se requiera.

Aquí, como ejemplos del agente tensoactivo, pueden mencionarse ácido oleico, lecitina, dioleato de dietilenglicol, oleato de tetrahidrofurfurilo, oleato de etilo, miristato de isopropilo, trioleato de glicerilo, monolaurato de glicerilo, monooleato de glicerilo, monoestearato de glicerilo, monolisinoato de glicerilo, alcohol cetílico, alcohol estearílico, polietilenglicol 400, cloruro de cetilpiridinio, trioleato de sorbitán (nombre de fábrica, Span 85), monooleato de sorbitán (nombre de fábrica, Span 80), monolaurato de sorbitán (nombre de fábrica, Span 20), aceite de ricino endurecido de polioxietileno (nombre de fábrica, HCO-60), monolaurato de polioxietileno (20) sorbitán (nombre de fábrica, Tween 20), monooleato de polioxietileno (20) sorbitán (nombre de fábrica, Tween 80), lecitina originada de recurso natural (nombre de fábrica, EPICLON), éter de oleilpolioxietileno (2) (nombre de fábrica, Brij 92), éter de estearil polioxietileno (2) (nombre de fábrica, Brij 72), éter de lauril polioxietileno (4) (nombre de fábrica, Brij 30), éter de oleilpolioxietileno (2) (nombre de fábrica, Genapol 0-020), copolímero de bloque de oxietileno y oxipropileno (nombre de fábrica, Synperonic), y similares. Como

ejemplos del aceite, pueden mencionarse aceite de maíz, aceite de oliva, aceite de semilla de algodón, aceite de girasol, y similares. En el caso de un ungüento, una base farmacéuticamente aceptable adecuada (petrolato amarillo, petrolato blanco, parafina, plastibase, silicón, ungüento blanco, cera de abejas, manteca, aceites vegetales, ungüento hidrofílico, petrolato hidrofílico, lanolina purificada, lanolina hidrolizada, ungüento absorbente de agua, plastibase hidrofílica, ungüento de macrogol, y similares) se mezcla con un ingrediente activo, y se usa como una preparación.

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

La dosificación del farmacéutico de la presente invención varía dependiendo del tipo y la actividad del ingrediente activo, la seriedad de la enfermedad, la especie animal que está siendo el sujeto de administración, la aceptabilidad del sujeto al fármaco de administración, el peso corporal, la edad, y similares, y la dosificación usual, con base en la cantidad de ingrediente activo por día para un adulto,

puede ser de aproximadamente 0.0001 a aproximadamente 100 mg/kg, por ejemplo, de aproximadamente 0.0001 a aproximadamente 10 mg/kg, de preferencia de aproximadamente 0.005 a aproximadamente 1 mg/kg.

La presente invención provee también un vehículo de fase sólida que
5 tenga el aptámero y/o el complejo de la presente invención inmovilizado sobre el mismo. Como ejemplos del vehículo de fase sólida, puede mencionarse un sustrato, una resina, una placa (por ejemplo, placa de cavidades múltiples), un filtro, un cartucho, una columna y un material poroso. El sustrato puede ser uno usado en chips de ADN, chips de proteína, y similares; por ejemplo, pueden mencionarse sustratos de níquel-
10 PTFE (politetrafluoroetileno), sustratos de vidrio, sustratos de apatita, sustratos de silicio, sustratos de alúmina, y similares, y sustratos preparados recubriendo estos sustratos con un polímero, y similares. Como ejemplos de la resina, pueden mencionarse partículas de agarosa, partículas de sílice, un copolímero de acrilamida y N,N'-metilenbisacrilamida, partículas de divinilbenceno entrelazadas con poliestireno,
15 partículas de dextrán entrelazadas con epiclorohidrina, fibras de celulosa, polímeros entrelazados de arildextrán y N,N'-metilenbisacrilamida, polímeros sintéticos monodispersos, polímeros hidrofílicos monodispersos, Sepharose, Toyopearl, y similares, y también se incluyen resinas preparadas uniendo varios grupos funcionales a estas resinas. El vehículo de fase sólida de la presente invención puede ser útil, por
20 ejemplo, en la purificación, detección y cuantificación de MK.

El aptámero y/o el complejo de la presente invención pueden ser inmovilizados sobre un vehículo de fase sólida mediante un método conocido *per se*. Por ejemplo, puede mencionarse un método que introduce una sustancia de afinidad (por ejemplo, las descritas anteriormente) o un grupo funcional predeterminado en el
25 aptámero y/o el complejo de la presente invención, e inmovilizando entonces el aptámero o complejo sobre un vehículo de fase sólida por medio de la sustancia de afinidad o el grupo funcional predeterminado. La presente invención provee también

dichos métodos. El grupo funcional predeterminado puede ser un grupo funcional que puede ser sometido a una reacción de acoplamiento; por ejemplo, puede mencionarse un grupo amino, un grupo tiol, un grupo hidroxilo y un grupo carboxilo. La presente invención provee también un aptámero que tenga dicho grupo funcional introducido en el mismo.

La presente invención provee también un método de purificación y concentración de MK. El método de purificación y concentración de la presente invención puede comprender adsorber MK al vehículo de fase sólida de la presente invención, y eluir la MK adsorbida con un eluyente. La adsorción de MK al vehículo de fase sólida de la presente invención puede lograrse mediante un método conocido *per se*. Por ejemplo, una muestra que contenga MK (por ejemplo, cultivo de bacterias o células o sobrenadante de cultivo, o sangre), es introducida en el vehículo de fase sólida de la presente invención o una composición que contenga la misma. La elución de MK puede lograrse usando un eluyente tal como una solución neutra. El eluyente neutro no es particularmente limitado, y puede tener un pH de, por ejemplo, aproximadamente 6 a aproximadamente 9, de preferencia de aproximadamente 6.5 a aproximadamente 8.5, y más preferiblemente de aproximadamente 7 a aproximadamente 8. La solución neutra puede ser también una que comprenda, por ejemplo, una sal de potasio (por ejemplo, NaCl, KCl), una sal de magnesio (por ejemplo, MgCl₂), un agente tensoactivo (por ejemplo, Tween 20, Triton, NP40) o glicerina. El método de purificación y concentración de la presente invención puede comprender además lavar el vehículo de fase sólida usando una solución de lavado después de la absorción de MK. Como ejemplos de la solución de lavado, pueden mencionarse aquellas que contengan urea, un agente quelante (por ejemplo, EDTA), Tris, un ácido o un álcali, y similares. El método de purificación y concentración de la presente invención puede comprender además calentar el vehículo de fase sólida. Este paso permite la regeneración y esterilización del vehículo de fase sólida.

La presente invención provee también un método de detección y cuantificación de MK. El método de detección y cuantificación de la presente invención puede comprender medir MK usando el aptámero de la presente invención (por ejemplo, mediante el uso del complejo y el vehículo de fase sólida de la presente invención). El método de detección y cuantificación de MK puede realizarse de la misma manera como un método inmunológico, salvo que el aptámero de la presente invención se usa en lugar de un anticuerpo. Por lo tanto, mediante el uso del aptámero de la presente invención en lugar de un anticuerpo, de la misma manera como métodos tales como inmunoensayo de enzimas (EIA) (por ejemplo, ELISA competitiva directa, ELISA competitiva indirecta, ELISA en sandwich, radioinmunoensayo (RIA), inmunoensayo fluorescente (FIA), técnica Western blot (por ejemplo, uso como un sustituto de anticuerpo secundario en técnica Western blot), método de tinción inmunohistoquímica y método de distribución de células, puede realizarse la detección y cuantificación. Estos métodos pueden ser útiles, por ejemplo, en la medición del contenido de MK en un organismo vivo o muestra biológica, y en el diagnóstico de enfermedades relacionadas con MK.

Las descripciones en todas las publicaciones mencionadas en la presente, incluyendo patentes y especificaciones de solicitudes de patente, se incorporan en la presente como referencia en la presente invención al grado de que todas ellas han sido dadas expresamente.

La presente invención se describe en lo sucesivo en más detalle por medio de los siguientes ejemplos los cuales, sin embargo, nunca limitan el alcance de la invención.

EJEMPLO 1

Preparación de ácidos nucleicos que se unen específicamente a midcina 1

Se prepararon ácidos nucleicos que se unen específicamente a midcina usando el método SELEX. Se realizó SELEX con mejoras del método de Ellington *et al.* (Ellington y Szostak, Nature 346, 818-822, 1990), y el método de Tuerk *et al.* (Tuerk y Gold, Science 249, 505-510, 1990). Como la sustancia objetivo, se preparó midcina humana usando levadura con referencia a un método de Murasugi *et al.* (Murasugi y Tohma-Aiba, Protein Expression and Purification 27, 244-252, 2003). En lo sucesivo, a menos que se especifique de otra manera, midcina significa midcina humana. Se inmovilizó midcina sobre una resina de agarosa (Sepharose activada con NHS, fabricada por Amersham Bioscience) por aminoacoplamiento. El aminoacoplamiento se realizó como se indica en las especificaciones de Amersham Bioscience. La cantidad inmovilizada se confirmó examinando la solución de midcina poco antes de la inmovilización, y el sobrenadante poco después de la inmovilización por SDS-PAGE. Como resultado de la SDS-PAGE, no se detectó banda de midcina alguna en el sobrenadante; se confirmó que casi toda la midcina usada había sido acoplada. Esto significa que aproximadamente 175 µg de midcina fueron inmovilizados a aproximadamente 70 µL de la resina.

El ARN usado en la primera ronda (ARN 40N) se obtuvo transcribiendo un ADN químicamente sintetizado usando el equipo de transcripción DuraScribe™ T7 (fabricado por Epicentre). El ARN obtenido por este método tiene la posición 2' de la ribosa del nucleótido de pirimidina sustituida con fluoro. El ADN de 94 nucleótidos de longitud mostrado a continuación, que tiene una secuencia de iniciador en cada extremo de una secuencia aleatoria de 40 nucleótidos, se usó como molde de ADN. El molde de ADN y los iniciadores se prepararon por síntesis química (fabricados por Operon).

Molde de ADN: 5'-tcctcattcctgtcctcta-40N-ttctcttctcctctccc-3' (SEQ ID NO:

71)

Iniciador delantero: 5'-taatacgactcactatagggagaggagaagaggaa-3' (SEQ ID

NO: 72)

Iniciador inverso: 5'-tcctcattcctgtcctcta-3' (SEQ ID NO: 73).

N representa cualquiera de A, G, C y T. El iniciador delantero comprende una secuencia de promotor de ARN polimerasa de T7. La variación del grupo de ARN usado en la primera ronda, fue teóricamente de 10^{14} .

5 El depósito de ARN se añadió a la resina inmovilizada con midcina, y se dejó que reposara a temperatura ambiente por 30 minutos. Después de 30 minutos, para remover el ARN no unido a midcina, la resina se lavó con solución A. Aquí, la solución A era una solución mixta de cloruro de sodio 145 mM, cloruro de potasio 5.4 mM, cloruro de calcio 1.8 mM, cloruro de magnesio 0.8 mM y Tris 20 mM (pH 7.6). El
10 ARN unido a midcina se recuperó por medio de calentamiento a 95°C por 10 minutos con la adición de un eluyente. Como el eluyente, se usó una solución mixta de urea 7 M, EDTA 3 mM y TRIS 100 mM, ajustado a pH 6.6. El ARN recuperado se amplificó por RT-PCR y se transcribió usando el equipo de transcripción DuraScribe™ T7, y se usó como el depósito para la siguiente ronda. Con este procedimiento tomado como ronda
15 1, la misma operación se realizó en 7 rondas. Después de concluir el método SELEX, el producto de PCR fue clonado en el vector pGEM-T Easy (fabricado por Promega), y la cepa DH5α de *Escherichia coli* (producida por Toyobo) fue transformada con el mismo. Después de que el plásmido se extrajo de una colonia individual, las secuencias de bases de 48 clones se determinaron usando un secuenciador de ADN (ABI PRISM
20 3100, fabricado por ABI).

Después de que el método SELEX se realizó en 7 rondas, se examinaron las secuencias; las secuencias exhibieron convergencia. Existieron 20 copias de la secuencia mostrada por SEQ ID NO: 1, y existió una copia de la forma sustituida con 2 bases. Existieron dos copias de la secuencia mostrada por SEQ ID NO: 2. Existió una
25 copia de cada una de las secuencias mostradas por SEQ ID NO: 3 a 5. Las estructuras secundarias de las moléculas de ARN mostradas por SEQ ID NO: 1 a 5 se estimaron usando el programa MFOLD (M. Zuker, Nucleic Acids Res. 31 (13), 3406-3415, 2003).

Como resultado, se observaron estructuras de espira interna-tallo-espira de la horquilla morfológicamente similares a las moléculas de ARN mostradas por SEQ ID NO: 2, 3, y 4 (figuras 1 a 5). Todas las espiras de las horquillas se formaron de ocho nucleótidos; 2 y 3 fueron formas sustituidas con 1 base comparadas con SEQ ID NO: 4. Respecto a los tallos, se configuró SEQ ID NO: 2 con dos pares de bases, y se configuraron SEQ ID NO: 3 y 4 con tres pares de bases.

Cada secuencia de nucleótidos se muestra en lo siguiente. Los paréntesis en cada nucleótido muestran modificaciones en la posición 2', y F es átomo de flúor (en lo sucesivo, el mismo).

10 SEQ ID NO: 1:
gggagaggagaagaggaaau(F)agu(F)u(F)aaggggu(F)gaau(F)u(F)u(F)gc(F)gaaagc(F)u(F)au(F)u(F)u(F)u(F)agu(F)c(F)gc(F)agu(F)agaggac(F)aggaau(F)gagga

 SEQ ID NO: 2:
gggagaggagaagaggaaggac(F)u(F)aagu(F)aagagaac(F)ac(F)c(F)ggaau(F)gaagggac(F)u(F)u(F)ac(F)gu(F)gu(F)agaggac(F)aggaau(F)gagga

 SEQ ID NO: 3:
gggagaggagaagaggaaagc(F)c(F)u(F)u(F)c(F)u(F)ac(F)c(F)gaaagu(F)gggaaagc(F)ac(F)ac(F)au(F)aaau(F)c(F)u(F)ggu(F)agaggac(F)aggaau(F)gaga

20 SEQ ID NO: 4:
gggagaggagaagaggaac(F)gu(F)gc(F)u(F)c(F)u(F)gu(F)ac(F)gaggagu(F)agc(F)c(F)ggaaagaaggc(F)ggu(F)gu(F)gu(F)agaggac(F)aggaau(F)gaga

 SEQ ID NO: 5:
gggagaggagaagaggaagu(F)gu(F)gc(F)ac(F)aggggu(F)u(F)ggu(F)gu(F)c(F)gggu(F)gc(F)au(F)ac(F)agu(F)au(F)aagau(F)agaggac(F)aggaau(F)gaga

25 Secuencia de la espira de la horquilla:

 SEQ ID NO: 2 -ggaaugaa-

 SEQ ID NO: 3 -ggaaagca-

SEQ ID NO: 4 -ggaaagaa-

EJEMPLO 2

Preparación de ácidos nucleicos que se unen específicamente a midcina 2

5

Para preparar aptámeros que se unen a midcina pero que no se unen a pleiotrofina, se realizó el método SELEX en la proteína de la familia de midcina, incluyendo pre-sustracción usando pleiotrofina. Primero, como con midcina, se inmovilizó pleiotrofina a resina de agarosa por aminoacoplamiento. Después, se añadió el depósito de ARN a la resina unida a pleiotrofina, y se dejó que reposara a temperatura ambiente por 30 minutos. Después, sólo se recuperó el sobrenadante. Teóricamente, este sobrenadante no debe contener un ARN que se una a la pleiotrofina. Este sobrenadante se añadió a la resina unida a midcina, y se realizó el método SELEX de la misma manera como en el ejemplo 1. La pleiotrofina usada había sido expresada en levaduras por el método de Murasugi *et al.* (Murasugi, Kido, Kumai y Asami, Biosci. Biotech. Biochem. 67 (10), 2288-2290, 2003). El molde de ADN y los iniciadores usados, fueron iguales a los que se usaron en el ejemplo 1.

Después de concluir 7 rondas, se verificaron las secuencias de 48 clones; se observó convergencia en las secuencias. Entre ellas, existieron diez copias de la misma secuencia como SEQ ID NO: 3 obtenida en el ejemplo 1, y existió una copia de la forma sustituida con 1 base. Existieron seis copias de la misma secuencia como SEQ ID NO: 2, y existieron dos copias de la forma sustituida con 1 base. Además, existió una copia de la misma secuencia como SEQ ID NO: 5.

25

EJEMPLO 3

Preparación de ácidos nucleicos que se unen específicamente a midcina 3

Cuando se inmoviliza midcina por aminoacoplamiento, porciones importantes pueden colapsarse, dependiendo del sitio de aminoacoplamiento. Por lo tanto, se realizó el método SELEX con unión a filtración usando una membrana de nitrocelulosa, que no implica inmovilización a un vehículo. Esto tiene el propósito de

5 separar ácidos nucleicos que se unen a la proteína objetivo, y ácidos nucleicos que no se unen, sobre la base del hecho de que es probable que las proteínas se unan a las membranas de nitrocelulosa, mientras que es improbable que los ácidos nucleicos se unan. Se mezclaron un depósito de ARN y midcina, se dejó que reposaran por 30 minutos a temperatura ambiente, y entonces la mezcla se filtró usando una membrana

10 de nitrocelulosa. Después de que la membrana de nitrocelulosa se lavó completamente con solución A, la membrana de nitrocelulosa se sumergió en el eluyente B, y se calentó a 90°C por 5 minutos. Después, de la misma manera como en el ejemplo 1, se recuperó el ARN por precipitación con etanol, se amplificó por RT-PCR, y se transcribió al depósito de ARN para la siguiente ronda. El molde de ADN y los iniciadores usados

15 fueron iguales a los usados en el ejemplo 1. El eluyente B es un líquido mixto de fenol a 50% y urea 6 M.

Después de concluir seis rondas, se verificaron las secuencias de 48 clones; no se obtuvo convergencia suficiente. Por lo tanto, se realizó el método SELEX en tres rondas más. Después de concluir las nueve rondas, se verificaron las

20 secuencias de los 48 clones; se observó convergencia suficiente. Entre las secuencias, existieron 21 copias de la misma secuencia como SEQ ID NO: 2, y existieron cuatro copias de la forma sustituida con 1 base. Existieron diez copias de la misma secuencia como SEQ ID NO: 4. Se descubrieron tres nuevas secuencias, ninguna de las cuales exhibió convergencia.

EJEMPLO 4

Evaluación de las actividades de unión por el método de resonancia de plasmones de superficie

5 Se examinaron las actividades de unión de las moléculas de ARN mostradas por SEQ ID NO: 1 a 5 para midcina, mediante un método de resonancia de plasmones de superficie. Las mediciones se realizaron usando BIAcore2000, fabricado por BIAcore. El chip sensor usado fue el chip SA, que tenía estreptavidina inmovilizada sobre el mismo. Unidas al mismo había aproximadamente 1000 RU de una poli dT de 10 16 nucleótidos con biotina unida al extremo 5' de la misma. El ARN siendo el ligando tenía una poli A de 16 nucleótidos añadida al extremo 3' del mismo, e inmovilizada al chip SA por medio de un enlace entre dT y A. La cantidad inmovilizada fue aproximadamente 1000 RU. Se inyectaron 70 µL de midcina para el analito, preparado a 0.5 µM. El regulador de pH de prueba usado para BIAcore, fue solución A. Como 15 resultado de las mediciones, se encontró que todas las moléculas de ARN mostradas por SEQ ID NO: 1 a 5 se unieron a midcina (figura 6). Para control negativo, se realizó una medición similar con el ARN 40N, que comprendía una secuencia aleatoria de 40 nucleótidos, inmovilizada. Como resultado, se encontró que el ARN 40N poseía también afinidad por midcina. El grado fue alto a niveles similares para las afinidades de las 20 moléculas de ARN mostradas por SEQ ID NO: 1 a 5. Debido a que la midcina contiene grandes cantidades de aminoácidos básicos tales como lisina, se espera que se una no específicamente a ácidos nucleicos cargados negativamente.

 Por lo tanto, se realizó una medición usando como el regulador de pH de prueba para BIAcore un regulador de pH con una alta concentración de sales (solución 25 B) preparada cambiando la concentración de cloruro de sodio de solución A a 500 mM. Se anticipó que usando el regulador de pH con una alta concentración de sales, podría reducirse la adsorción no específica de unión iónica. Como resultado de la medición, se

encontró que el ARN 40N difícilmente se unía a la midcina. Mientras tanto, las moléculas de ARN mostradas por SEQ ID NO: 2 a 5 se unieron a la midcina a mayores grados que con el ARN 40N (figura 7). El hecho de la unión a la alta concentración de sales, significa que es probable que el enlace sea un enlace hidrofóbico. Esto sugiere que estas moléculas de ARN pueden no ser unidas no específicamente a la porción de lisina, pero que reconocen específicamente a la midcina.

Después, se realizó un experimento en el cual se inmovilizó midcina al chip sensor CM4 por aminoacoplamiento, y se inyectó el ARN mostrado por SEQ ID NO: 4 ó 5, como analito, por el cual se verificó la afinidad del ARN y la midcina. Se logró la inmovilización de la midcina usando N-hidroxisuccinimida (NHS, 11 mg/L) y clorhidrato de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC, 75 mg/mL), según las especificaciones de BIAcore. Se diluyó midcina con regulador de pH de HBS-EP (fabricado por BIAcore), y se usó a una concentración de 20 µg/mL. Para bloqueo, se usó clorhidrato de etanolamina 1 M (pH 8.5). Se inmovilizó MK (1-59, MK-N, fabricada por Peptide Institute, Inc.) a la célula de flujo 2 de un chip sensor, se inmovilizó MK (60-121, MK-C, fabricada por Peptide Institute, Inc.) a la célula de flujo 3, y se inmovilizó midcina de longitud completa (MK-NC) a la célula de flujo 4. La célula de flujo 1 se usó como una célula para control. Mediante la inmovilización de 3 tipos de midcina y fragmento de midcina a un chip sensor como se describió anteriormente, pueden medirse a la vez las afinidades por tres tipos de ligandos. Como resultado de la medición, se encontró que el ARN mostrado por SEQ ID NO: 4 se unió a midcina de longitud completa (en lo sucesivo, escrita como MK-NC) y el dominio C de midcina (en lo sucesivo, escrito como MK-C), pero no se unió al dominio N de midcina (en lo sucesivo, escrito como MK-N) (cuadro 1). Mientras tanto, el ARN mostrado por SEQ ID NO: 5 se unió a MK-NC, MK-N y MK-C, pero la afinidad fue mayor para MK-N que para MK-C.

CUADRO 1

Afinidad de la midcina y varios analitos

	Midcina		
	De longitud completa	MK-N	MK-C
SEQ ID NO:4	+++	-	++
SEQ ID NO:5	+++	++	+
Heparina	+++	+	+++
Sulfato de condroitina E	+++	+	+++
Sulfato de condroitina C	+	-	+
ARNt	+++	-	+++

Medida por el método de resonancia de plasmones de superficie. Se inmovilizó midcina al chip sensor CM4, y se inyectaron varios analitos. La afinidad es mayor en el orden de +++, ++, + y -.

Se realizaron experimentos similares usando como analito, en lugar de ARN, heparina (heparina, sal de sodio, mucosa intestinal de porcino, bajo peso molecular, PM: 5000, fabricada por Calbiochem), sulfato de condroitina E (de cartílago de calamar, fabricado por Seikagaku Corporation), sulfato de condroitina C (de cartílago de tiburón, PM: 40,000 a 80,000, fabricado por Seikagaku Corporation) o ARNt (fabricado por Sigma). Como resultado, se encontró que todos estos analitos tuvieron baja afinidad por MK-N, y se unieron principalmente a MK-C (cuadro 1).

De lo anterior, se encontró que el ARN mostrado por SEQ ID NO: 4, al igual que la heparina y similares, se unió al dominio C de la midcina. Mientras tanto, se encontró que el ARN mostrado por SEQ ID NO: 5 tuvo baja afinidad por el dominio C y se unió más fuertemente al dominio N. Esto muestra que las moléculas de ARN mostradas por SEQ ID NO: 4 y 5 se unen a diferentes sitios de la midcina. Se sabe que la midcina tiene en el dominio C de la misma un sitio activo que es un sitio de unión a heparina (Muramatsu H *et al.*, Biochem Biophys Res Commun. Sep 15 de 1994; 203(2): 1131-9, 106; Iwasaki W *et al.*, EMBO J. Dic 1 de 1997; 16(23): 6936-46).



Se determinó si o no el ARN mostrado por SEQ ID NO: 5 poseía una actividad de unión para la proteína de la familia de la midcina, pleiotrofina, por el método de resonancia de plasmones de superficie como se describió anteriormente. El ARN fue inmovilizado al chip sensor SA, y se inyectó pleiotrofina 0.5 µM. Para reducir la adsorción no específica, se añadieron 0.4 mg/mL de ARNt a la solución de pleiotrofina. Como resultado de la medición, se encontró que el ARN mostrado por SEQ ID NO: 5 poseía una actividad de unión por la pleiotrofina, pero que el grado fue menor que aquella para la midcina. Mediante el uso del ARN 40N como el ligando, se realizó una medición similar. Tanto la midcina como la pleiotrofina se unieron al ARN 40N, pero el grado fue menor que aquel para el ARN mostrado por SEQ ID NO: 5. El ARN 40N exhibió mayor afinidad por la midcina que por la pleiotrofina. De lo anterior, se encontró que la pleiotrofina, al igual que la midcina, poseía una propensión a unirse a ácidos nucleicos. Se encontró también que el ARN mostrado por SEQ ID NO: 5 poseía mayor afinidad por la midcina que por la pleiotrofina.

Después, se determinó si o no las moléculas de ARN mostradas por SEQ ID NO: 4 y 5 poseían afinidad por otras proteínas. Como las proteínas, se usaron IgG1 humana (fabricada por Calbiochem) y albúmina humana (fabricada por Sigma). Cada ARN fue inmovilizado usando el chip sensor SA como se describió anteriormente, y se inyectó cada proteína como analito. Como resultado, la IgG1 humana y la albúmina humana no se unieron en lo absoluto a ninguna de las moléculas de ARN mostradas por SEQ ID NO: 4 y 5. De lo anterior, se encontró que las moléculas de ARN mostradas por SEQ ID NO: 4 y 5 no se unieron a la albúmina humana ni a la IgG humana, las cuales están presentes en grandes cantidades en la sangre.

Se midieron las actividades de unión de las moléculas de ARN mostradas por SEQ ID NO: 2 a 7, 31, 32, 36, 40, 40-1 y 40-2 con MK. Como se describió anteriormente, la medición se realizó con MK inmovilizada al chip sensor CM4. Como resultado, se encontró que todas estas moléculas de ARN poseían afinidad por la MK.

EJEMPLO 5

Evaluación de aptámeros de ARN mediante experimento de inhibición de la migración celular

5 Se sabe que la midcina posee acción de infiltración de células progenitoras de osteoblastos (Qi *et al.*, J. Biol. Chem. 276 (19), 15868-15875, 2001). Por lo tanto, se examinó si o no los aptámeros de ARN preparados inhibían la actividad de migración celular de la midcina usando células UMR106 de una línea de células progenitoras de osteoblastos de rata (ATCC No. CRL1661). Se aplicaron 30 μ L de

10 midcina 1.5 μ M a la superficie exterior de la membrana de Chemotaxicell (diámetro de los poros de la membrana: 8 μ m, fabricada por Kurabo), para inmovilizar la midcina a la superficie exterior de la membrana. La membrana de Chemotaxicell inmovilizada con midcina se puso sobre una placa de cultivo de 24 cavidades que contenía 500 μ L de un medio (complementado con albúmina de suero de bovino a 0.3%, medio de Eagle

15 modificado de Dulbecco), complementado con cada aptámero de ARN añadido al mismo a 100 nM. Se pusieron 200 μ L de células UMR106 en la capa interior de la cámara de Chemotaxicell a una densidad de 1×10^6 células/mL, y se cultivaron a 37°C por 4 horas. Las células que permanecieron en la capa interior de la cámara de Chemotaxicell se removieron, y las células que se habían infiltrado y adherido a la

20 superficie aplicada con midcina, fueron fijadas con metanol. La cámara de Chemotaxicell se sumergió en una solución acuosa a 1% de cristal violeta por 30 minutos para teñir las células. Después de que la cámara de Chemotaxicell se lavó con agua destilada y se secó, se extrajo el pigmento con una solución mixta de 200 μ L de SDS a 1% y Triton X100 a 1%. Se transfirieron 150 μ L del extracto a una microplaca de

25 96 cavidades, y se determinó su absorbancia a 590 nm.

Como resultado de la medición, se encontró que las moléculas de ARN mostradas por SEQ ID NO: 1, 2, 4 y 5 poseían una actividad inhibidora notable de la

migración celular. Los resultados se muestran en el cuadro 2. El aptámero mostrado por SEQ ID NO: 5 exhibió la más alta actividad inhibidora, siendo la media para 14 mediciones de 76%. El ARN 40N, usado como el control negativo, casi no exhibió actividad inhibidora.

5

CUADRO 2

Actividades inhibidoras de la migración celular de aptámeros preparados contra midcina y pleiotrofina

SEQ ID NO:	Midcina		Pleiotrofina	
	Actividad inhibidora %	Número de mediciones	Actividad inhibidora %	Número de mediciones
1	36	4	0	2
2	45	4	-	-
4	63	6	8	2
5	76	14	17	6
ARN 40N	8	6	28	2

Concentración de ARN: 100 nM

15

Aquí, el por ciento de la actividad inhibidora es un valor que se obtiene restando el número de células que se mueven con la adición del aptámero, del número de células que se mueven sin la adición del aptámero (absorbancia del extracto de células teñidas) tomado como 100. En el cuadro, cada valor en % es la media para el número de mediciones indicadas.

20

Después, se midió si o no los aptámeros mostrados por SEQ ID NO: 4 y 5 poseían una actividad inhibidora de la migración celular contra la pleiotrofina. El experimento se realizó como se describió anteriormente, salvo que se usó pleiotrofina en lugar de midcina. Como resultado del experimento, se encontró que estos aptámeros no exhibieron una actividad inhibidora notable contra la pleiotrofina (cuadro 2).

25

Después, se midió si o no la heparina, el sulfato de condroitina E y el sulfato de condroitina C inhiben las actividades de migración celular de la midcina y

pleiotrofina. El experimento se realizó como se describió anteriormente, salvo que los aptámeros se reemplazaron con heparina, sulfato de condroitina E o sulfato de condroitina C. El suministro de heparina usado fue un producto fabricado por Nacalai Tesque. Los suministros de sulfato de condroitina E y C usados, fueron los mismos que aquellos usados en el ejemplo 4. Las concentraciones de heparina y sulfato de condroitina E fueron de 0.1, 1, 10 y 100 µg/mL. Como resultado del experimento, heparina a 0.1 µg/mL inhibió las actividades de migración celular de la midcina y pleiotrofina. A una concentración de 1 µg/mL, la heparina inhibió las actividades de migración celular de la midcina y pleiotrofina por no menos de 80%. Mientras tanto, el sulfato de condroitina E a una concentración de 10 µg/mL inhibió la midcina por 49% y la pleiotrofina por 69%. Asumiendo que el peso molecular del sulfato de condroitina C es de 40,000, el experimento se realizó a 500 nM (20 µg/mL). Como resultado, cuando la actividad inhibidora del aptámero mostrado por SEQ ID NO: 4 (500 nM) se tomó como 100, la actividad inhibidora del sulfato de condroitina C fue de 44.

De lo anterior, se encontró que los aptámeros mostrados por SEQ ID NO: 1, 2, 4 y 5 se unieron específicamente a la midcina para inhibir la actividad de migración celular de la misma. El ARN 40N fue adsorbido no específicamente electrostáticamente a la midcina, pero no inhibió la actividad de migración celular. Esto muestra que las moléculas de ARN que se habían obtenido por el método SELEX no son atribuibles a adsorción no específica, pero se unen a un sitio importante asociado con la actividad de migración celular. La heparina y el sulfato de condroitina E inhibieron equivalentemente la actividad de migración celular sin distinguir entre la midcina y la pleiotrofina. Mientras tanto, los aptámeros mostrados por SEQ ID NO: 4 y 5 inhibieron sólo la actividad de la midcina. Puesto que la midcina y la pleiotrofina tienen una homología de 50%, y también puesto que el sitio de unión a heparina está conservado a un alto nivel, las altas especificidades de los aptámeros son comprensibles.

EJEMPLO 6

Miniaturización y estabilización del aptámero mostrado por SEQ ID NO: 4

El aptámero mostrado por SEQ ID NO: 4 tiene 77 nucleótidos de longitud, 5 teniendo la posición 2' de la ribosa del nucleótido de pirimidina del mismo sustituida con fluoro. Para permitir la síntesis química, reducir la toxicidad y mejorar la estabilidad en la sangre, se realizaron miniaturización y estabilización de este aptámero. Las operaciones de miniaturización y estabilización se realizaron sobre la base de la estructura secundaria estimada por el programa MFOLD, y la actividad se evaluó 10 mediante un experimento de inhibición de la migración celular. En el experimento de inhibición de la migración celular, la concentración de ARN fue de 100 nM o 500 nM. Puesto que algunos errores ocurren en los resultados experimentales, dependiendo de la condición de la célula, una muestra previamente puesta a prueba se incluyó como un control positivo en cada medición. Las actividades inhibitoras obtenidas cuando la 15 concentración de ARN fue de 500 nM, se muestran en el cuadro 3 (cuadros 3-1 y 3-2). Las actividades inhibitoras se expresan como valores relativos con la actividad del aptámero mostrado por SEQ ID NO: 4 tomada como 100, para clarificar las diferencias de actividad entre las formas alteradas. El por ciento de actividad inhibidora del aptámero mostrado por SEQ ID NO: 4 (un valor obtenido restando el número de células 20 que se mueven con la adición del aptámero de 100, que es el número de células que se mueven sin la adición del aptámero) fue de 73% cuando la concentración de ARN fue de 500 nM. Esta es la media para 4 mediciones. La media para 6 mediciones del por ciento de actividad inhibidora fue de 63% cuando la concentración de ARN fue de 100 nM.

CUADRO 3-1

Actividades inhibidoras de la migración celular de formas alteradas del ARN

mostrado por SEQ ID NO: 4 contra midcina

SEQ ID NO:	Actividad	Número de mediciones	Longitud (nucleótidos)
4	100	2	77
	57 (ratón)	2	
6	110	2	67
7	91	2	64
8	100	2	69
9	57	2	66
10	81	2	73
11	100	2	77
12	100	2	58
13	100	2	50
14	100	2	54
15	75	2	56
16	61	2	57
17	68	2	46
18	88	2	37
19	94	2	44
20	97	2	42
20-1	109	2	42
20-2	84	2	42
20-3	60	2	42
20-4	60	2	42
20-5	88	2	42
20-6	69	2	42
20-7	88	2	42
20-8	99	2	42
20-9	130	2	42
20-10	86	2	42
20-11	76	2	42
20-12	53	2	42
20-13	89	2	42

CUADRO 3-2

SEQ ID NO:	Actividad	Número de mediciones	Longitud (nucleótidos)
21	0	2	44
22	70	6	33
23	66	2	38
24	65	2	38
25	81	2	41
26	18	2	41
27	78	2	41
28	71	2	31
29	74	2	31
Sulfato de condroitina C	44	2	

5

10

La concentración de ARN fue de 500 nM. Las actividades se expresan como valores relativos con la actividad del ARN mostrado por SEQ ID NO: 4 tomada como 100. El por ciento de actividad inhibidora del ARN mostrado por SEQ ID NO: 4 fue de 73%. Este valor es la media para 4 mediciones. (ratón) indica un valor relacionado con la midcina de ratón.

15

Las partes alteradas en las formas alteradas (SEQ ID NOs: 6-29) se explican a continuación.

SEQ ID NO: 6: Se deletaron 10 nucleótidos de la parte de cadena sencilla en el lado del extremo 3' de ARN mostrado por SEQ ID NO: 4.

gggagaggagaagaggaac(F)gu(F)gc(F)u(F)c(F)u(F)gu(F)ac(F)gaggagu(F)agc(F)c(F)ggaa
20 agaaggc(F)ggu(F)gu(F)gu(F)agaggac(F)a

SEQ ID NO: 7: Se deletaron 14 nucleótidos de la parte de cadena sencilla en el lado del extremo 5' de ARN mostrado por SEQ ID NO: 4, y se añadió una G para transcripción.

gggaac(F)gu(F)gc(F)u(F)c(F)u(F)gu(F)ac(F)gaggagu(F)agc(F)c(F)ggaaagaaggc(F)ggu(
25 F)gu(F)gu(F)agaggac(F)aggaau(F)gagga

SEQ ID NO: 8: Se deletaron 4 pares de bases del tallo en el lado del extremo de ARN mostrado por SEQ ID NO: 4.

gggagaggagaagaggaac(F)gc(F)u(F)gu(F)ac(F)gaggagu(F)agc(F)c(F)ggaaagaaggc(F)gg
u(F)gu(F)gu(F)agc(F)aggaau(F)gagga

SEQ ID NO: 9: Se deletaron 8 nucleótidos de la espira interna y CGG en el lado opuesto de la misma, de ARN mostrado por SEQ ID NO: 4.

5 gggagaggagaagaggaac(F)gu(F)gc(F)u(F)c(F)u(F)gu(F)ac(F)gc(F)c(F)ggaaagaaggu(F)g
u(F)gu(F)agaggac(F)aggaau(F)gagga

SEQ ID NO: 10: Se reemplazó la porción de espira con la tetraespira de GAAA, en ARN mostrado por SEQ ID NO: 4.

10 gggagaggagaagaggaac(F)gu(F)gc(F)u(F)c(F)u(F)gu(F)ac(F)gaggagu(F)agc(F)c(F)gaaa
ggc(F)ggu(F)gu(F)gu(F)agaggac(F)aggaau(F)gagga

SEQ ID NO: 11: Se reemplazaron 3 pares de bases de G-U con pares de bases de G-C en el tallo en el lado del extremo de ARN mostrado por SEQ ID NO: 4.

gggagaggagaagaggaac(F)gu(F)gc(F)u(F)c(F)u(F)gc(F)ac(F)gaggagu(F)agc(F)c(F)ggaa
agaaggc(F)ggc(F)gu(F)gc(F)agaggac(F)aggaau(F)gagga

15 SEQ ID NO: 12: Se reemplazaron tres pares de bases de G-U con pares de bases de G-C en el tallo en el lado del extremo, y se deletaron 11 nucleótidos de la parte de cadena sencilla en el lado del extremo 3' de ARN mostrado por SEQ ID NO: 8.

gggagaggagaagaggaac(F)gc(F)u(F)gc(F)ac(F)gaggagu(F)agc(F)c(F)ggaaagaaggc(F)gg
c(F)gu(F)gc(F)agc(F)

20 SEQ ID NO: 13: Se deletaron 11 nucleótidos de la parte de cadena sencilla en el lado del extremo 5' de ARN mostrado por SEQ ID NO: 12, y se añadió a la misma GGG para transcripción.

gggagaggaac(F)gc(F)u(F)gc(F)ac(F)gaggagu(F)agc(F)c(F)ggaaagaaggc(F)ggc(F)gu(F)g
c(F)agc(F)

25 SEQ ID NO: 14: Se deletaron un par de bases de G-C y un par de bases de C-G del tallo en el lado del extremo de ARN mostrado por SEQ ID NO: 12.

gggagaggagaagaggaac(F)gc(F)u(F)ac(F)gaggagu(F)agc(F)c(F)ggaaagaaggc(F)ggc(F)g

u(F)agc(F)

SEQ ID NO: 15: Se deletaron A36 y A37 de la porción de espira de ARN mostrado por SEQ ID NO: 12.

gggagaggagaagaggaac(F)gc(F)u(F)gc(F)ac(F)gaggagu(F)agc(F)c(F)ggaaagggc(F)ggc(

5 F)gu(F)gc(F)agc(F)

SEQ ID NO: 16: Se deletó A23 de la porción de espira interna de ARN mostrado por SEQ ID NO: 12.

gggagaggagaagaggaac(F)gc(F)u(F)gc(F)ac(F)gaggggu(F)agc(F)c(F)ggaaagaaggc(F)ggc(

F)gu(F)gc(F)agc(F)

10 SEQ ID NO: 17: Se deletaron un par de bases de G-C y un par de bases de C-G del tallo en el lado del extremo de ARN mostrado por SEQ ID NO: 13.

gggagaggaac(F)gc(F)u(F)ac(F)gaggagu(F)agc(F)c(F)ggaaagaaggc(F)ggc(F)gu(F)agc(F)

15 SEQ ID NO: 18: Se deletaron 11 nucleótidos de la parte de cadena sencilla en el lado del extremo 5' de ARN mostrado por SEQ ID NO: 17, y se añadió a la misma GG para transcripción.

gggc(F)u(F)ac(F)gaggagu(F)agc(F)c(F)ggaaagaaggc(F)ggc(F)gu(F)agc(F)

SEQ ID NO: 19: Se deletó un par de bases de C-G de la parte del tallo en el lado del extremo de ARN mostrado por SEQ ID NO: 17.

gggagaggaac(F)gu(F)ac(F)gaggagu(F)agc(F)c(F)ggaaagaaggc(F)ggc(F)gu(F)ac(F)

20 SEQ ID NO: 20: Se deletaron un par de bases de C-G y un par de bases de U-A de la parte del tallo en el lado del extremo de ARN mostrado por SEQ ID NO: 17.

gggagaggaac(F)gac(F)gaggagu(F)agc(F)c(F)ggaaagaaggc(F)ggc(F)gu(F)c(F)

25 SEQ ID NO: 20-1: La parte de cadena sencilla de ARN mostrado por SEQ ID NO: 20, fue enteramente modificada con OMe.

g(M)g(M)g(M)a(M)g(M)a(M)g(M)g(M)a(M)a(M)c(F)gac(F)gaggagu(F)agc(F)c(F)ggaaagaaggc(F)ggc(F)gu(F)c(F)

SEQ ID NO: 20-2: El primer tallo en el ARN mostrado por SEQ ID NO: 20, fue modificado con OMe.

gggagaggaac(F)g(M)a(M)c(F)g(M)aggagu(F)agc(F)c(F)ggaaagaaggc(F)ggc(F)g(M)u(F)c(F)

5 SEQ ID NO: 20-3: El segundo tallo en el ARN mostrado por SEQ ID NO: 20, fue modificado con OMe.

gggagaggaac(F)gac(F)gaggagu(F)ag(M)c(F)c(F)ggaaagaag(M)g(M)c(F)ggc(F)gu(F)c(F)

SEQ ID NO: 20-4: La G en la parte de espira del ARN mostrado por SEQ ID NO: 20, fue reemplazada con OMe.

10 gggagaggaac(F)gac(F)gaggagu(F)agc(F)c(F)g(M)g(M)aaag(M)aaggc(F)ggc(F)gu(F)c(F)

SEQ ID NO: 20-5: La A en la parte de protuberancia del ARN mostrado por SEQ ID NO: 20-1, fue reemplazada con OMe.

g(M)g(M)g(M)a(M)g(M)a(M)g(M)g(M)a(M)a(M)c(F)gac(F)ga(M)gga(M)gu(F)a(M)gc(F)c(F)ggaaagaaggc(F)ggc(F)gu(F)c(F)

15 SEQ ID NO: 20-6: La G en la parte de protuberancia del ARN mostrado por SEQ ID NO: 20-1, fue reemplazada con OMe.

g(M)g(M)g(M)a(M)g(M)a(M)g(M)g(M)a(M)a(M)c(F)gac(F)gag(M)g(M)ag(M)u(F)agc(F)c(F)ggaaagaaggc(F)ggc(F)gu(F)c(F)

20 SEQ ID NO: 20-7: La A en la parte de espira del ARN mostrado por SEQ ID NO: 20-1, fue modificada con OMe.

g(M)g(M)g(M)a(M)g(M)a(M)g(M)g(M)a(M)a(M)c(F)gac(F)gaggagu(F)agc(F)c(F)gga(M)a(M)gaaggc(F)ggc(F)gu(F)c(F)

SEQ ID NO: 20-8: La A en la parte de espira del ARN mostrado por SEQ ID NO: 20-5, fue modificada con OMe.

25 g(M)g(M)g(M)a(M)g(M)a(M)g(M)g(M)a(M)a(M)c(F)gac(F)ga(M)gga(M)gu(F)a(M)gc(F)c(F)gga(M)aa(M)gaaggc(F)ggc(F)gu(F)c(F)

SEQ ID NO: 20-9: El primer tallo en el ARN mostrado por SEQ ID NO: 20-

5, fue modificado con OMe.

g(M)g(M)g(M)a(M)g(M)a(M)g(M)g(M)a(M)a(M)c(F)g(M)a(M)c(F)ga(M)gga(M)gu(F)a(M)g
c(F)c(F)ggaaagaaggc(F)ggc(F)g(M)u(F)c(F)

SEQ ID NO: 20-10: Algunas partes del ARN mostrado por SEQ ID NO: 20-

5, fueron modificadas con OMe.

g(M)g(M)g(M)a(M)g(M)a(M)g(M)g(M)a(M)a(M)c(F)gac(F)ga(M)gga(M)gu(F)a(M)gc(F)c(
F)ggaaagaaggc(F)g(M)g(M)c(F)gu(F)c(F)

SEQ ID NO: 20-11: Algunas partes del ARN mostrado por SEQ ID NO: 20-

5, fueron modificadas con OMe.

10 g(M)g(M)g(M)a(M)g(M)a(M)g(M)g(M)a(M)a(M)c(F)g(M)a(M)c(F)ga(M)gga(M)gu(F)a(M)g
c(F)c(F)gga(M)aa(M)gaaggc(F)g(M)g(M)c(F)g(M)u(F)c(F)

SEQ ID NO: 20-12: Algunas partes del ARN mostrado por SEQ ID NO: 20-

5, fueron modificadas con OMe.

15 g(M)g(M)g(M)a(M)g(M)a(M)g(M)g(M)a(M)a(M)c(F)g(M)a(M)c(F)ga(M)gga(M)gu(F)a(M)g
c(F)c(F)gga(M)aa(M)g(M)aaggc(F)ggc(F)g(M)u(F)c(F)

SEQ ID NO: 20-13: Algunas partes del ARN mostrado por SEQ ID NO: 20-

5, fueron modificadas con OMe.

20 g(M)g(M)g(M)a(M)g(M)a(M)g(M)g(M)a(M)a(M)c(F)g(M)a(M)c(F)ga(M)gga(M)gu(F)a(M)g
c(F)c(F)gga(M)aa(M)gaag(M)gc(F)ggc(F)g(M)u(F)c(F)

SEQ ID NO: 21: Se deletó un par de bases de G-C de la parte del tallo en
el lado de espira del ARN mostrado por SEQ ID NO: 17.

gggagaggaac(F)gc(F)u(F)ac(F)gaggagu(F)agc(F)ggaaagaagc(F)ggc(F)gu(F)agc(F)

SEQ ID NO: 22: Se deletaron 11 nucleótidos de la parte de cadena
sencilla en el lado del extremo 5' de ARN mostrado por SEQ ID NO: 20, y se añadieron
25 dos Gs para transcripción.

gggac(F)gaggagu(F)agc(F)c(F)ggaaagaaggc(F)ggc(F)gu(F)c(F)

SEQ ID NO: 23: Se reemplazó la porción de espira con la tetraespira de

GAAA en el ARN mostrado por SEQ ID NO: 20.

gggagaggaac(F)gac(F)gaggagu(F)agc(F)c(F)gaaaggc(F)ggc(F)gu(F)c(F)

SEQ ID NO: 24: Se reemplazó la porción de espira con la tetraespira de UUCG en el ARN mostrado por SEQ ID NO: 20.

5 gggagaggaac(F)gac(F)gaggagu(F)agc(F)c(F)u(F)u(F)c(F)gggc(F)ggc(F)gu(F)c(F)

SEQ ID NO: 25: La porción de espira interna en el ARN mostrado por SEQ ID NO: 20 se reemplazó con la espira interna del aptámero mostrado por SEQ ID NO: 2.

gggagaggaac(F)gac(F)gagaac(F)agc(F)c(F)ggaaagaaggc(F)ggc(F)gu(F)c(F)

10 SEQ ID NO: 26: Se deletó G18 de la espira interna en el ARN mostrado por SEQ ID NO: 20.

gggagaggaac(F)gac(F)gagagu(F)agc(F)c(F)ggaaagaaggc(F)ggc(F)gu(F)c(F)

SEQ ID NO: 27: Se deletó A19 de la espira interna en el ARN mostrado por SEQ ID NO: 20.

15 gggagaggaac(F)gac(F)gaggggu(F)agc(F)c(F)ggaaagaaggc(F)ggc(F)gu(F)c(F)

SEQ ID NO: 28: Se removieron dos G del extremo 5', y el segundo par de bases de A-U fue cambiado a G-C en el ARN mostrado por SEQ ID NO: 22.

ggc(F)gaggagu(F)agc(F)c(F)ggaaagaaggc(F)ggc(F)gc(F)c(F)

20 SEQ ID NO: 29: Se removieron dos G del extremo 5' del ARN mostrado por SEQ ID NO: 22.

gac(F)gaggagu(F)agc(F)c(F)ggaaagaaggc(F)ggc(F)gu(F)c(F).

Se examinó a la actividad inhibidora de la migración celular del aptámero mostrado por SEQ ID NO: 4 contra midcina de ratón. El método experimental fue igual al usado para el experimento descrito anteriormente sobre midcina humana. Como resultado del experimento, el por ciento de actividad inhibidora de este aptámero fue de 50%. Esto es equivalente a aproximadamente 57 respecto a la actividad inhibidora de este aptámero contra la midcina humana tomada como 100; la actividad disminuyó

evidentemente, en comparación con la actividad inhibidora contra la medicina humana. De esta manera, se encontró que este aptámero es un aptámero que exhibe una mayor actividad inhibidora contra la medicina humana.

Como se muestra en el cuadro 3, el aptámero mostrado por SEQ ID NO: 4, que originalmente era de 77 nucleótidos de longitud, pudo ser miniaturizado hasta 31 nucleótidos, sin que se redujera considerablemente la actividad (SEQ ID NO: 28, 29). La porción de espira de la horquilla de este aptámero obtenido no necesita ser siempre GGAAAGAA; el aptámero retuvo la actividad incluso cuando la porción de espira de la horquilla fue la tetraespira de GAAA o UUCG (SEQ ID NO: 23, 24). Incluso cuando la porción de espira interna fue reemplazada con la porción de espira interna del aptámero mostrado por SEQ ID NO: 2, se retuvo la actividad (SEQ ID NO: 25). Incluso cuando se deletó A19, se retuvo la actividad, pero cuando se deletó G18, la actividad disminuyó extremadamente (SEQ ID NO: 26, 27). Mientras tanto, se encontró que cuando se deletó el par de bases de C-G del tallo en el lado de la espira, la estructura secundaria cambió ampliamente y se perdió la actividad inhibidora (SEQ ID NO: 21). De lo anterior, se encontró que el aptámero de 42 nucleótidos mostrado por SEQ ID NO: 20 (FIG. 8) retuvo la actividad incluso después de que algunos nucleótidos son reemplazados con otros nucleótidos o deletados, siempre que la estructura básica del mismo no cambiara ampliamente.

EJEMPLO 7

Miniaturización y estabilización del aptámero mostrado por SEQ ID NO: 5

El aptámero mostrado por SEQ ID NO: 5 tiene 77 nucleótidos de longitud, teniendo la posición 2' de la ribosa del nucleótido de pirimidina sustituida con fluoro. Para permitir la síntesis química, reducir la toxicidad y mejorar la estabilidad en la sangre, se realizaron miniaturización y estabilización de este aptámero. Las

operaciones de miniaturización y estabilización se realizaron sobre la base de la estructura secundaria estimada por el programa MFOLD, y la actividad se evaluó mediante un experimento de inhibición de la migración celular. La concentración de ARN en el experimento de inhibición de la migración celular fue de 100 nM o 500 nM.

- 5 Puesto que algunos errores ocurren en los resultados experimentales, dependiendo de la condición de la célula, una muestra previamente puesta a prueba se incluyó como un control positivo en cada medición. Las actividades inhibitoras obtenidas cuando la concentración de ARN fue de 100 nM, se muestran en el cuadro 4-1. Las actividades inhibitoras se expresan como valores relativos con la actividad del aptámero mostrado por SEQ ID NO: 5 tomada como 100, para clarificar las diferencias de actividad entre las formas alteradas. El por ciento de actividad inhibitora del aptámero mostrado por SEQ ID NO: 5 (un valor obtenido restando el número de células que se mueven con la adición del aptámero de 100, que es el número de células que se mueven sin la adición del aptámero) fue de 76% cuando la concentración de ARN fue de 100 nM. Esta es la media para 14 mediciones. Con la concentración de ARN cambiada a 500 nM, se realizó un experimento similar. Los resultados se muestran en el cuadro 4-2 (cuadro 4-2-1-, cuadro 4-2-2). Las actividades se expresan como valores relativos, con la actividad del aptámero mostrado por SEQ ID NO: 40 tomada como 100. El por ciento de actividad inhibitora del aptámero mostrado por SEQ ID NO: 40, fue de 82%. Esta es la media para 4 mediciones.

CUADRO 4-1

SEQ ID NO:	Midcina		Pleiotrofina		Longitud (nucleótidos)
	Actividad	Número de mediciones	Actividad	Número de mediciones	
5	100	14	13	6	77
30	44	2	-	-	71
31	94	6	17	4	67
32	100	6	11	4	57
33	40	6	5	4	61
34	0	2	-	-	46
35	90	4	0	2	51
36	91	4	27	2	53
36-1	60	4	0	2	53
37	0	2	-	-	49
38	0	2	-	-	57
39	52	2	-	-	45
40	98	4	0	2	49
40-1	80	2	-	-	49
40-2	31	2	-	-	49
40-3	65	2	-	-	49
41	97	4	8.1	2	52
42	110	4	8.7	2	52
43	42	2	-	-	52

La concentración de ARN fue de 100 nM. Las actividades se expresan como valores relativos, con la actividad inhibidora del ARN mostrado por SEQ ID NO: 5 contra la midcina tomada como 100. El por ciento de actividad inhibidora del ARN mostrado por SEQ ID NO: 5 contra la midcina, fue de 76%. Este valor es la media para 14 mediciones.

CUADRO 4-2-1

SEQ ID NO:	Actividad	Número de mediciones	Longitud (nucleótidos)
40	100	2	49
40-1	99	2	49
40-2	88	2	49
40-3	100	2	49
44	100	2	47
45	100	2	45
45-1	100	2	45
45-2	100	2	45
45-3	56	2	45
45-4	100	2	45
45-4-1	98*	2	45
45-4-1-1	85*	2	45
46	92	2	49
47	84	2	48
48	60	2	48
49	69	2	48
50	91	2	43
51	100	2	51
52	100	2	51
53	100	2	51
54	100	2	45
55	100	2	43
56	100	2	43
57	100	2	43
58	100	2	43
59	53	2	29
60	70	2	35

5

10

15

CUADRO 4-2-2

SEQ ID NO:	Actividad	Número de mediciones	Longitud (nucleótidos)
61	100	2	39
61-1	45*	2	39
61-2	55*	2	39
61-3	80	2	39
61-4	86	4	39
61-5	40	4	39
61-6	57	2	39
61-7	46	2	39
61-8	54	4	39
61-9	39	2	39
62	44	2	39
63	97	2	45
64	55*	2	37
65	0	2	39
66	51	2	38
67	110	2	38
68	72	2	39
69	60	2	39
70	110	2	39
ARNt	28	2	
Trombina-S	0	2	
HIV-S	48	2	

La concentración de ARN fue de 500 nM. Las actividades se expresan como valores relativos, con la actividad inhibidora del ARN mostrado por SEQ ID NO: 40 contra la midcina tomada como 100. El por ciento de actividad inhibidora del ARN mostrado por SEQ ID NO: 40 contra la midcina, fue de 82%. Estos valores son medias para 4 mediciones.

*: Valor tentativamente identificado.

Las partes alteradas en las formas alteradas (SEQ ID NOs: 30-70) se explican a continuación.

SEQ ID NO: 30: Se deletaron 6 nucleótidos de la parte de cadena sencilla en el lado del extremo 5' de ARN mostrado por SEQ ID NO: 5, y se añadió una G para transcripción.

ggagaagaggaagu(F)gu(F)gc(F)ac(F)aggggu(F)u(F)ggu(F)gu(F)c(F)gggu(F)gc(F)au(F)ac

(F)agu(F)au(F)aagau(F)agaggac(F)aggaau(F)gagga

SEQ ID NO: 31: Se deletaron 10 nucleótidos de la parte de cadena sencilla en el lado del extremo 3' de ARN mostrado por SEQ ID NO: 5.

5 gggagaggagaagaggaagu(F)gu(F)gc(F)ac(F)aggggu(F)u(F)ggu(F)gu(F)c(F)gggu(F)gc(F)
au(F)ac(F)agu(F)au(F)aagau(F)agaggac(F)a

SEQ ID NO: 32: Se deletaron 20 nucleótidos de la parte de cadena sencilla en el lado del extremo 3' de ARN mostrado por SEQ ID NO: 5.

gggagaggagaagaggaagu(F)gu(F)gc(F)ac(F)aggggu(F)u(F)ggu(F)gu(F)c(F)gggu(F)gc(F)
10 au(F)ac(F)agu(F)au(F)aag

SEQ ID NO: 33: Se deletaron 6 nucleótidos de la parte de cadena sencilla en el lado del extremo 5', y se deletaron 10 nucleótidos de la parte de cadena sencilla en el lado del extremo 3' de ARN mostrado por SEQ ID NO: 5.

ggagaagaggaagu(F)gu(F)gc(F)ac(F)aggggu(F)u(F)ggu(F)gu(F)c(F)gggu(F)gc(F)au(F)ac
(F)agu(F)au(F)aagau(F)agaggac(F)a

15 SEQ ID NO: 34: Se deletaron 12 nucleótidos de la parte de cadena sencilla en el lado del extremo 5', y se deletaron 20 nucleótidos de la parte de cadena sencilla en el lado del extremo 3' de ARN mostrado por SEQ ID NO: 5.

ggaggaagu(F)gu(F)gc(F)ac(F)aggggu(F)u(F)ggu(F)gu(F)c(F)gggu(F)gc(F)au(F)ac(F)agu
(F)au(F)aag

20 SEQ ID NO: 35: Se deletaron 6 nucleótidos de la parte de cadena sencilla en el lado del extremo 3' de ARN mostrado por SEQ ID NO: 32.

gggagaggagaagaggaagu(F)gu(F)gc(F)ac(F)aggggu(F)u(F)ggu(F)gu(F)c(F)gggu(F)gc(F)
au(F)ac(F)ag

25 SEQ ID NO: 36: Se deletaron dos pares de bases del tallo en el lado del extremo de ARN mostrado por SEQ ID NO: 32.

gggagaggagaagaggaagu(F)gc(F)ac(F)aggggu(F)u(F)ggu(F)gu(F)c(F)gggu(F)gc(F)ac(F)
agu(F)au(F)aag

SEQ ID NO: 36-1: La parte de cadena sencilla en el lado del extremo 5' de ARN mostrado por SEQ ID NO: 36, fue modificada enteramente con OMe.

g(M)g(M)g(M)a(M)g(M)a(M)g(M)g(M)a(M)g(M)a(M)a(M)g(M)a(M)g(M)g(M)a(M)a(M)gu(F)
)gc(F)ac(F)aggggu(F)u(F)ggu(F)gu(F)c(F)gggu(F)gc(F)ac(F)agu(F)au(F)aag

5 SEQ ID NO: 37: Se deletaron cuatro pares de bases del tallo en el lado del extremo de ARN mostrado por SEQ ID NO: 32.

gggagaggagaagaggaagc(F)ac(F)aggggu(F)u(F)ggu(F)gu(F)c(F)gggu(F)gc(F)agu(F)au(F)
)aag

10 SEQ ID NO: 38: La parte de cadena sencilla en el lado del extremo 5' de ARN mostrado por SEQ ID NO: 32 fue cambiada a poli U, en donde U muestra ribosa fluorada en la posición 2'.

gggu(F)u(F)u(F)u(F)u(F)u(F)u(F)u(F)u(F)u(F)u(F)u(F)u(F)u(F)gu(F)gu(F)gc(F)ac(F)a
ggggu(F)u(F)ggu(F)gu(F)c(F)gggu(F)gc(F)au(F)ac(F)agu(F)au(F)aag

15 SEQ ID NO: 39: Se deletaron 6 nucleótidos de la parte de cadena sencilla en el lado del extremo 3', y se deletó un par de bases del tallo en el lado del extremo de ARN mostrado por SEQ ID NO: 36.

gggagaggagaagaggaaggc(F)ac(F)aggggu(F)u(F)ggu(F)gu(F)c(F)gggu(F)gc(F)c(F)ag

20 SEQ ID NO: 40: Se deletaron 8 nucleótidos de la parte de cadena sencilla en el lado del extremo 3' de ARN mostrado por SEQ ID NO: 36.

gggagaggagaagaggaagu(F)gu(F)gc(F)ac(F)aggggu(F)u(F)ggu(F)gu(F)c(F)gggu(F)gc(F)
au(F)ac(F)

25 SEQ ID NO: 40-1: Se añadió polietilenglicol con peso molecular de 2000 al extremo 5' por medio del enlazador C12, y se añadió idT al extremo 3' de ARN mostrado por SEQ ID NO: 40.

PEG2000-C12-

gggagaggagaagaggaagu(F)gu(F)gc(F)ac(F)aggggu(F)u(F)ggu(F)gu(F)c(F)gggu(F)gc(F)
au(F)ac(F)-idT

SEQ ID NO: 40-2: Todas las G en la parte de cadena sencilla en el lado del extremo 5' de ARN mostrado por SEQ ID NO: 40, fueron modificados con OMe.

g(M)g(M)g(M)ag(M)ag(M)g(M)ag(M)aag(M)ag(M)g(M)aagu(F)gu(F)gc(F)ac(F)aggggu(F)
u(F)ggu(F)gu(F)c(F)gggu(F)gc(F)au(F)ac(F)

5 SEQ ID NO: 40-3: Todas las A en la parte de cadena sencilla en el lado del extremo 5' de ARN mostrado por SEQ ID NO: 40, fueron modificadas enteramente con OMe.

ggga(M)ga(M)gga(M)ga(M)a(M)ga(M)gga(M)a(M)gu(F)gu(F)gc(F)ac(F)aggggu(F)u(F)gg
u(F)gu(F)c(F)gggu(F)gc(F)au(F)ac(F)

10 SEQ ID NO: 41: Se deletó G5 de la parte de cadena sencilla en el lado del extremo 5' de ARN mostrado por SEQ ID NO: 36.

gggaaggagaagaggaagu(F)gc(F)ac(F)aggggu(F)u(F)ggu(F)gu(F)c(F)gggu(F)gc(F)ac(F)a
gu(F)au(F)aag

15 SEQ ID NO: 42: Se deletó A11 de la parte de cadena sencilla en el lado del extremo 5' de ARN mostrado por SEQ ID NO: 36.

gggagaggagagaggaagu(F)gc(F)ac(F)aggggu(F)u(F)ggu(F)gu(F)c(F)gggu(F)gc(F)ac(F)a
gu(F)au(F)aag

20 SEQ ID NO: 43: Se deletó A17 de la parte de cadena sencilla en el lado del extremo 5' de ARN mostrado por SEQ ID NO: 36.

gggagaggagaagaggagu(F)gc(F)ac(F)aggggu(F)u(F)ggu(F)gu(F)c(F)gggu(F)gc(F)ac(F)a
gu(F)au(F)aag

25 SEQ ID NO: 44: Se deletó un par de bases del tallo en el lado del extremo de ARN mostrado por SEQ ID NO: 40.

gggagaggagaagaggaagu(F)u(F)gc(F)ac(F)aggggu(F)u(F)ggu(F)gu(F)c(F)gggu(F)gc(F)a
ac(F)

SEQ ID NO: 45: Se deletaron dos pares de bases del tallo en el lado del extremo de ARN mostrado por SEQ ID NO: 40.

gggagaggagaagaggaagu(F)gc(F)ac(F)aggggu(F)u(F)ggu(F)gu(F)c(F)gggu(F)gc(F)ac(F)

SEQ ID NO: 45-1: Se añadió polietilenglicol con peso molecular de 2000 al extremo 5' por medio del enlazador C12, y se añadió idT al extremo 3' de ARN mostrado por SEQ ID NO: 45.

5 PEG2000-C12-

ggga(M)ga(M)gga(M)ga(M)a(M)ga(M)gga(M)a(M)gu(F)gc(F)ac(F)aggggu(F)u(F)ggu(F)g
u(F)c(F)gggu(F)gc(F)ac(F)-idT

SEQ ID NO: 45-2: Todas las A en la parte de cadena sencilla, y todas las G en la parte de espiro en el lado del extremo 5' de ARN mostrado por SEQ ID NO: 45,
10 fueron modificadas enteramente con OMe.

ggga(M)ga(M)gga(M)ga(M)a(M)ga(M)gga(M)a(M)gu(F)gc(F)ac(F)agggg(M)u(F)u(F)g(M)
g(M)u(F)g(M)u(F)c(F)gggu(F)gc(F)ac(F)

SEQ ID NO: 45-3: Todas las A en la parte de cadena sencilla, y todas las A y G en la parte de espiro interna en el lado del extremo 5' de ARN mostrado por SEQ
15 ID NO: 45, fueron modificadas enteramente con OMe.

ggga(M)ga(M)gga(M)ga(M)a(M)ga(M)gga(M)a(M)gu(F)gc(F)ac(F)a(M)g(M)gggu(F)u(F)g
gu(F)gu(F)c(F)g(M)g(M)gu(F)gc(F)ac(F)

SEQ ID NO: 45-4: Todas las A en la parte de cadena sencilla en el lado del extremo 5', y todas las A y G en la parte del tallo en el lado del extremo de ARN
20 mostrado por SEQ ID NO: 45, fueron modificadas enteramente con OMe.

ggga(M)ga(M)gga(M)ga(M)a(M)ga(M)gga(M)a(M)gu(F)g(M)c(F)a(M)c(F)aggggu(F)u(F)g
gu(F)gu(F)c(F)gggu(F)g(M)c(F)a(M)c(F)

SEQ ID NO: 45-4-1: Todas las G en la parte de espiro del ARN mostrado por SEQ ID NO: 45-4, fueron modificadas enteramente con OMe.

25 gggga(M)ga(M)gga(M)ga(M)a(M)ga(M)gga(M)a(M)g(M)u(F)g(M)c(F)a(M)c(F)aggg(M)g(M)
u(F)u(F)g(M)g(M)u(F)g(M)u(F)c(F)gggu(F)g(M)c(F)a(M)c(F)

SEQ ID NO: 45-4-1-1: C24 del ARN mostrado por SEQ ID NO: 45-4-1, fue

cambiado a nucleótido de ARN.

ggga(M)ga(M)gga(M)ga(M)a(M)ga(M)gga(M)a(M)g(M)u(F)g(M)c(F)a(M)caggg(M)g(M)u(F)u(F)g(M)g(M)u(F)g(M)u(F)c(F)gggu(F)g(M)c(F)a(M)c(F)

5 SEQ ID NO: 46: Se reemplazó el par de bases de A-U con el par de bases de G-C en el tallo en el lado del extremo de ARN mostrado por SEQ ID NO: 40.

gggagaggagaagaggaagu(F)gc(F)gc(F)gc(F)aggggu(F)u(F)ggu(F)gu(F)c(F)gggc(F)gc(F)gu(F)ac(F)

SEQ ID NO: 47: Se deletó U32 de la espiro de ARN mostrado por SEQ ID NO: 40.

10 gggagaggagaagaggaagu(F)gu(F)gc(F)ac(F)aggggu(F)ggu(F)gu(F)c(F)gggu(F)gc(F)au(F)ac(F)

SEQ ID NO: 48: Se deletó G34 de la espiro de ARN mostrado por SEQ ID NO: 40.

15 gggagaggagaagaggaagu(F)gu(F)gc(F)ac(F)aggggu(F)u(F)gu(F)gu(F)c(F)gggu(F)gc(F)au(F)ac(F)

SEQ ID NO: 49: Se deletó U36 de la espiro de ARN mostrado por SEQ ID NO: 40.

gggagaggagaagaggaagu(F)gu(F)gc(F)ac(F)aggggu(F)u(F)ggu(F)c(F)gggu(F)gc(F)au(F)ac(F)

20 SEQ ID NO: 50: Se deletaron G4 y G10 de la parte de cadena sencilla en el lado del extremo 5' de ARN mostrado por SEQ ID NO: 45.

gggaaggaaagaggaagu(F)gc(F)ac(F)aggggu(F)u(F)ggu(F)gu(F)c(F)gggu(F)gc(F)ac(F)

SEQ ID NO: 51: Se deletaron G5 y A11 de la parte de cadena sencilla en el lado del extremo 5' de ARN mostrado por SEQ ID NO: 36.

25 gggaaggagagaggaagu(F)gc(F)ac(F)aggggu(F)u(F)ggu(F)gu(F)c(F)gggu(F)gc(F)ac(F)agu(F)au(F)aag

SEQ ID NO: 52: Se deletaron G1 y G5 de la parte de cadena sencilla en el

lado del extremo 5' de ARN mostrado por SEQ ID NO: 36.

ggaaggagaagaggaagu(F)gc(F)ac(F)aggggu(F)u(F)ggu(F)gu(F)c(F)gggu(F)gc(F)ac(F)ag
u(F)au(F)aag

5 SEQ ID NO: 53: Se deletaron G5 y G10 de la parte de cadena sencilla en
el lado del extremo 5' de ARN mostrado por SEQ ID NO: 36.

gggaaggaaagaggaagu(F)gc(F)ac(F)aggggu(F)u(F)ggu(F)gu(F)c(F)gggu(F)gc(F)ac(F)ag
u(F)au(F)aag

10 SEQ ID NO: 54: Todas las G fueron modificadas con F, y todas las A
fueron modificadas con OMe en la parte de cadena sencilla en el lado del extremo 5' de
ARN mostrado por SEQ ID NO: 45.

g(F)g(F)g(F)a(M)g(F)a(M)g(F)g(F)a(M)g(F)a(M)a(M)g(F)a(M)g(F)g(F)a(M)a(M)gu(F)gc(F)
)ac(F)aggggu(F)u(F)ggu(F)gu(F)c(F)gggu(F)gc(F)ac(F)

15 SEQ ID NO: 55: Se deletaron A11 y A12 de la parte de cadena sencilla en
el lado del extremo 5' de ARN mostrado por SEQ ID NO: 45.

gggagaggaggaggaagu(F)gc(F)ac(F)aggggu(F)u(F)ggu(F)gu(F)c(F)gggu(F)gc(F)ac(F)

 SEQ ID NO: 56: Se deletaron G13 y A14 de la parte de cadena sencilla en
el lado del extremo 5' de ARN mostrado por SEQ ID NO: 45.

gggagaggagaaggaagu(F)gc(F)ac(F)aggggu(F)u(F)ggu(F)gu(F)c(F)gggu(F)gc(F)ac(F)

20 SEQ ID NO: 57: Se deletaron G15 y G16 de la parte de cadena sencilla en
el lado del extremo 5' de ARN mostrado por SEQ ID NO: 45.

gggagaggagaagaaagu(F)gc(F)ac(F)aggggu(F)u(F)ggu(F)gu(F)c(F)gggu(F)gc(F)ac(F)

 SEQ ID NO: 58: Se deletaron A17 y A18 de la parte de cadena sencilla en
el lado del extremo 5' de ARN mostrado por SEQ ID NO: 45.

gggagaggagaagaggggu(F)gc(F)ac(F)aggggu(F)u(F)ggu(F)gu(F)c(F)gggu(F)gc(F)ac(F)

25 SEQ ID NO: 59: Se deletaron 18 nucleótidos de la parte de cadena
sencilla en el lado del extremo 5' de ARN mostrado por SEQ ID NO: 45, y se añadieron
dos Gs para transcripción.

gggu(F)gc(F)ac(F)aggggu(F)u(F)ggu(F)gu(F)c(F)gggu(F)gc(F)ac(F)

SEQ ID NO: 60: La parte de cadena sencilla en el lado del extremo 5' de ARN mostrado por SEQ ID NO: 45, fue cambiada a GGGAAGGA.

gggaaggagu(F)gc(F)ac(F)aggggu(F)u(F)ggu(F)gu(F)c(F)gggu(F)gc(F)ac(F)

5 SEQ ID NO: 61: Se deletaron G5, G10, A11, A12, G13 y A14 de la parte de cadena sencilla en el lado del extremo 5' de ARN mostrado por SEQ ID NO: 45.

gggaaggaggaagu(F)gc(F)ac(F)aggggu(F)u(F)ggu(F)gu(F)c(F)gggu(F)gc(F)ac(F)

SEQ ID NO: 61-1: Se modificó la G con nucleótido de ADN, y se modificó A con OMe en la parte de cadena sencilla, y se modificó G en la parte de espira con OMe en el lado del extremo 5' de ARN mostrado por SEQ ID NO: 61.

g(H)g(H)g(H)a(M)a(M)g(H)g(H)a(M)g(H)g(H)a(M)a(M)gu(F)gc(F)ac(F)aggggu(F)u(F)ggu(F)gu(F)c(F)gggu(F)gc(F)ac(F)

15 SEQ ID NO: 61-2: G y A en la parte de cadena sencilla, y G en la parte de espira en el lado del extremo 5' de ARN mostrado por SEQ ID NO: 61, fueron modificadas con OMe.

g(M)g(M)g(M)a(M)a(M)g(M)g(M)a(M)g(M)g(M)a(M)a(M)gu(F)gc(F)ac(F)aggggu(F)u(F)ggu(F)gu(F)c(F)gggu(F)gc(F)ac(F)

SEQ ID NO: 61-3: Cierta parte del ARN mostrado por SEQ ID NO: 61, fue modificada con F y OMe.

20 g(F)g(F)g(F)a(M)a(M)g(F)g(F)a(M)g(F)g(F)a(M)a(M)g(M)u(F)g(M)c(F)a(M)c(F)a(M)g(F)g(M)g(M)g(M)u(F)u(F)g(M)g(M)u(F)g(M)u(F)c(F)g(F)g(F)g(M)u(F)g(M)c(F)a(M)c(F)

SEQ ID NO: 61-4: Cierta parte del ARN mostrado por SEQ ID NO: 61, fue modificada con OMe.

25 ggga(M)a(M)gga(M)gga(M)a(M)g(M)u(F)g(M)c(F)a(M)c(F)aggg(M)g(M)u(F)u(F)g(M)g(M)u(F)g(M)u(F)c(F)gggu(F)g(M)c(F)a(M)c(F)

SEQ ID NO: 61-5: Se añadió una cadena de polietilenglicol de 40 kDa ramificada al extremo 5', y se añadió idT al extremo 3' del ARN mostrado por SEQ ID

NO: 61-5.

PEG40k-

ggga(M)a(M)gga(M)gga(M)a(M)g(M)u(F)g(M)c(F)a(M)c(F)aggg(M)g(M)u(F)u(F)g(M)g(M)
)u(F)g(M)u(F)c(F)gggu(F)g(M)c(F)a(M)c(F)-idT

5 SEQ ID NO: 61-6: Se añadió una cadena de polietilenglicol de 30 kDa a
ambos extremos del ARN mostrado por SEQ ID NO: 61-5.

PEG30k-

ggga(M)a(M)gga(M)gga(M)a(M)g(M)u(F)g(M)c(F)a(M)c(F)aggg(M)g(M)u(F)u(F)g(M)g(M)
)u(F)g(M)u(F)c(F)gggu(F)g(M)c(F)a(M)c(F)-PEG30k

10 SEQ ID NO: 61-7: Cierta parte del ARN mostrado por SEQ ID NO: 61, fue
modificada con OMe.

ggga(M)a(M)gga(M)gga(M)a(M)g(M)u(F)g(M)c(F)a(M)c(F)aggg(M)g(M)u(F)u(F)g(M)g(M)
)u(F)g(M)u(F)c(F)g(M)g(M)gu(F)g(M)c(F)a(M)c(F)

15 SEQ ID NO: 61-8: Cierta parte del ARN mostrado por SEQ ID NO: 61, fue
modificada con OMe.

ggga(M)a(M)gga(M)gga(M)a(M)g(M)u(F)g(M)c(F)a(M)c(F)a(M)g(M)gg(M)g(M)u(F)u(F)g(M)
g(M)u(F)g(M)u(F)c(F)gggu(F)g(M)c(F)a(M)c(F)

 SEQ ID NO: 61-9: Cierta parte del ARN mostrado por SEQ ID NO: 61 fue
modificada con OMe, y se añadió polietilenglicol de 2 KDa al extremo 5'.

20 PEG2000-

ggga(M)a(M)gga(M)gga(M)a(M)g(M)u(F)g(M)c(F)a(M)c(F)a(M)gg(M)g(M)g(M)u(F)u(F)g(M)
g(M)u(F)g(M)u(F)c(F)ggg(M)u(F)g(M)c(F)a(M)c(F)

 SEQ ID NO: 62: Se deletaron G13, A14, G15, G16, A17 y A18 de la parte
de cadena sencilla en el lado del extremo 5' de ARN mostrado por SEQ ID NO: 45.

25 gggagaggagaagu(F)gc(F)ac(F)aggggu(F)u(F)ggu(F)gu(F)c(F)gggu(F)gc(F)ac(F)

 SEQ ID NO: 63: A25 y G26 en el ARN mostrado por SEQ ID NO: 45,
fueron cambiadas a C para obtener la espira interna como tallo.

gggagaggagaagaggaagu(F)gc(F)ac(F)c(F)c(F)gggu(F)u(F)ggu(F)gu(F)c(F)gggu(F)gc(F)
ac(F)

SEQ ID NO: 64: Se deletó U-A del tallo en el lado del extremo 5' de ARN
mostrado por SEQ ID NO: 61.

5 ggggaaggaggaaggc(F)ac(F)aggggu(F)u(F)ggu(F)gu(F)c(F)gggu(F)gc(F)c(F)

SEQ ID NO: 65: A19 y G20 en la espira interna de ARN mostrado por SEQ
ID NO: 61, fueron reemplazadas con C.

gggaaggaggaagu(F)gc(F)ac(F)c(F)c(F)gggu(F)u(F)ggu(F)gu(F)c(F)gggu(F)gc(F)ac(F)

10 SEQ ID NO: 66: Cierta parte del ARN mostrado por SEQ ID NO: 61 fue
modificada con OMe, y G fue modificada con F.

g(F)g(F)a(M)a(M)g(F)g(F)a(M)g(F)g(F)a(M)a(M)g(M)u(F)g(M)c(F)a(M)c(F)a(M)gg(M)g(
M)g(M)u(F)u(F)g(M)g(M)u(F)g(M)u(F)c(F)g(F)g(F)g(M)u(F)g(M)c(F)a(M)c(F)

SEQ ID NO: 67: Se cambió la modificación del ARN mostrado por SEQ ID
NO: 66.

15 gga(M)a(M)gga(M)gga(M)a(M)g(M)u(F)g(M)c(F)a(M)c(F)aggg(M)g(M)u(F)u(F)g(M)g(M)
u(F)g(M)u(F)c(F)gggu(F)g(M)c(F)a(M)c(F)

SEQ ID NO: 68: Cierta parte del ARN mostrado por SEQ ID NO: 61 fue
modificada con OMe, y U28 fue reemplazado con A(M).

20 gggga(M)a(M)gga(M)gga(M)a(M)g(M)u(F)g(M)c(F)a(M)c(F)aggg(M)g(M)u(F)u(F)g(M)g(M)
)a(M)g(M)u(F)c(F)gggu(F)g(M)c(F)a(M)c(F)

SEQ ID NO: 69: Cierta parte del ARN mostrado por SEQ ID NO: 61 fue
modificada con OMe, y U25 fue reemplazado con A(M).

ggga(M)a(M)gga(M)gga(M)a(M)g(M)u(F)g(M)c(F)a(M)c(F)aggg(M)g(M)u(F)a(M)g(M)g(M)
)u(F)g(M)u(F)c(F)gggu(F)g(M)c(F)a(M)c(F)

25 SEQ ID NO: 70: Cierta parte del ARN mostrado por SEQ ID NO: 61 fue
modificada con OMe, y U24 fue reemplazado con A(M).

ggga(M)a(M)gga(M)gga(M)a(M)g(M)u(F)g(M)c(F)a(M)c(F)aggg(M)g(M)a(M)u(F)g(M)g(M)
)u(F)g(M)u(F)c(F)gggu(F)g(M)c(F)a(M)c(F)

Aquí, n(M) representa ribosa modificada con OMe en la posición 2', n(F) representa ribosa modificada con F en la posición 2', n(H) representa desoxirribosa,
5 PEG2000 representa un polietilenglicol de 2000 Da, PEG40k representa un polietilenglicol ramificado de 40kDa, PEG30k representa un polietilenglicol de 30 kDa, C12 representa un enlazador de C12 e idT representa dT invertida.

Se realizó un experimento sobre la inhibición de la migración celular por pleiotrofina por el aptámero mostrado por SEQ ID NO: 5 y formas alteradas del mismo.
10 El método experimental fue como se describió anteriormente, salvo que se usó pleiotrofina en lugar de midcina. La concentración del aptámero fue de 100 nM, y la actividad inhibidora del aptámero mostrado por SEQ ID NO: 5 contra la midcina se tomó como 100. Como resultado del experimento, la actividad inhibidora contra la pleiotrofina fue de 13 (cuadro 4-1). Esta es la media para 6 mediciones. En las formas alteradas, no
15 se observó actividad inhibidora notable contra la pleiotrofina.

Se examinó la actividad inhibidora de la migración celular del aptámero mostrado por SEQ ID NO: 35 contra midcina de ratón. El experimento fue igual al método experimental descrito anteriormente usando midcina humana. Como resultado del experimento, el por ciento de actividad inhibidora de este aptámero fue de 84%. De
20 esta manera, se encontró que este aptámero posee una actividad contra la midcina de ratón equivalente a la actividad inhibidora contra la midcina humana.

Mediante el uso de ARNt (fabricado por Sigma), trombina-S y HIV-S, los cuales es improbable que se unan específicamente a la midcina, en lugar de los aptámeros, se realizó un experimento de inhibición de la migración celular para midcina
25 humana como se describió anteriormente. Aquí, trombina-S es un aptámero de ADN de t'ggttggtggtggtg'aaaaaaaaaaaaaaaa (SEQ ID NO: 74), y HIV-S es un aptámero de ADN de g'tggtgggtgggtggg't (SEQ ID NO: 75). Cada " ' " representa un enlace de

fosforotioato. Los enlaces de fosforotioato se añadieron para incrementar la resistencia a nucleasas. Estas moléculas de ARN se usaron a 500 nM. Cuando la actividad inhibidora del aptámero mostrado por SEQ ID NO: 45 contra la midcina humana se tomó como 100, se determinó que la actividad del ARNt es de 28, de la trombina-S es de 0, y de HIV-S es de 48. Por lo tanto, se sugirió que los aptámeros preparados en el presente estudio podrían ser unidos específicamente a sitios importantes asociados con la actividad de migración celular de la midcina.

El aptámero mostrado por SEQ ID NO: 5, que tenía 77 nucleótidos de longitud, pudo ser miniaturizado hasta 39 nucleótidos, sin que redujera considerablemente la actividad (SEQ ID NO: 61). La porción de cadena sencilla en el extremo 5' no pudo ser deletada completamente; se postuló que esta porción de cadena sencilla está implicada en la formación de la estructura estérica del aptámero. Aunque la G de esta porción de cadena sencilla puede ser un nucleótido modificado con F, se encontró que la actividad disminuyó en el caso de nucleótidos modificados con OMe (SEQ ID NO: 40-2, 54, 61-2). Mientras tanto, incluso cuando la A era un nucleótido modificado con OMe, la actividad se mantuvo sin cambios (SEQ ID NO: 40-3). Incluso cuando algunos pares de bases de A-U fueron reemplazados con pares de bases de G-C en el tallo en el lado del extremo 5', la actividad no fue demasiado influenciada (SEQ ID NO: 46). Incluso cuando la A y la G de esta porción del tallo fueron reemplazadas con un nucleótido modificado con OMe, se retuvo la actividad (SEQ ID NO: 45-4). Incluso cuando la porción de espira interna fue reemplazada con una estructura de tallo de G-C por sustitución de nucleótidos, la actividad no cambió (SEQ ID NO: 63); sin embargo, cuando la porción de cadena sencilla fue acortada, la actividad disminuyó (SEQ ID NO: 59). Cuando la G y la A de la espira interna fueron reemplazadas con un nucleótido modificado con OMe, la actividad disminuyó (SEQ ID NO: 45-3). Cuando la porción de espira fue privada de 1 nucleótido, la actividad disminuyó (SEQ ID NO: 47 a

49). Incluso cuando la G de la porción de espira fue reemplazada con un nucleótido modificado con OMe, se retuvo la actividad (SEQ ID NO: 45-2).

De lo anterior, se encontró que la actividad de este aptámero obtenido no fue influenciada incluso sustituyendo algunas bases o cambiando la modificación. Se encontró también que este aptámero se unió específicamente a la midcina para inhibir la actividad de migración celular. Mientras tanto, se encontró que este aptámero se unió también a la proteína pleiotrofina, pero no posee una actividad inhibidora notable de la migración celular.

10

EJEMPLO 8

Efecto inhibitor del aptámero sobre la adherencia de órganos usando el modelo de formación de adherencias post-operatorio de ratón

20

Se abre el abdomen de un ratón normal, y se hace una incisión en el peritoneo con una cuchilla quirúrgica y similares, después de lo cual se secan los órganos internos, y entonces se sutura la parte laparotomizada; dentro de 5 días después, se observa la adherencia de órganos (Am J Obstet Gynecol 179, 438-443, 1998). Se reporta que cuando ratones con expresión bloqueada de midcina se trataron usando este método para causar la adherencia de órganos post-operatoria, no ocurrió adherencia post-operatoria de órganos (Biochemical and Biophysical Research Communication, 317, 108-113, 2004). Por lo tanto, mediante el uso del modelo de formación de adherencias post-operatorio de ratón, se investigó la adherencia de órganos post-operatoria que previene el efecto del aptámero mostrado por SEQ ID NO: 76. Bajo anestesia, un ratón C57BL/6 (hembra) de 8 semanas fue laparotomizado, después de lo cual se limpió el peritoneo con algodón absorbente. Después, se hizo una fisura de aproximadamente 2 cm en el peritoneo en cinco posiciones usando tijeras. Después de hemostasis con algodón absorbente por 10 minutos, se suturó la herida

usando aguja e hilo de coser. Después de la emergencia, el aptámero mostrado por SEQ ID NO: 76 se administró intraperitonealmente a una dosis de 1 mg/25 mL/kg. Para un grupo control, se administró intraperitonealmente solución salina que contenía MgCl₂ 1 mM a una dosis de 25 mL/kg de la misma manera. La administración ocurrió una vez al día en un total de tres veces en el día 0, día 1 y día 2 post-operatorio, después de lo cual el animal fue laparotomizado bajo anestesia en el día 3, y se evaluó el grado de adherencia de órganos a la herida usando los criterios mostrados a continuación.

- 0: sin adherencias
- 1: con adherencias, adherencia leve (leve)
- 2: sin adherencias, adherencia moderada (moderada)
- 3: con adherencias, adherencia severa que no pudo separarse jalando incluso el órgano en la porción adherente (severa).

Los resultados se muestran como las medias y errores estándar de puntuaciones del grado de adherencia para 9 a 10 animales en cada grupo (cuadro 5).

Como resultado, la puntuación fue de 3 en todos los animales en el grupo que recibió solución salina fisiológica, mientras que la puntuación media del grupo que recibió el aptámero mostrado por SEQ ID NO: 76, fue de 2.4. En el grupo que recibió el aptámero mostrado por SEQ ID NO: 76, en comparación con el grupo que recibió solución salina fisiológica, se observó una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05\%$). Para el procesamiento estadístico, se usó la prueba U de Mann-Whitney. De los resultados anteriores, se demostró que el aptámero mostrado por SEQ ID NO: 76 poseía una actividad de prevención de adherencia de órganos post-operatoria.

El aptámero mostrado por SEQ ID NO: 76 es como sigue. SEQ ID NO: 76: El ARN mostrado por SEQ ID NO: 40, en donde todas las "A"s de la porción de cadena sencilla del extremo 5' son modificadas con OMe, con colesterol (Chol) añadido al extremo 5' por medio de un enlazador de cadena de hidrocarburos saturada (C12) que tiene 12 átomos de carbono, y dT invertida (idT) añadida al extremo 3'.

Chol-C12-

ggga(M)ga(M)gga(M)ga(M)a(M)ga(M)gga(M)a(M)gu(F)gu(F)gc(F)ac(F)aggggu(F)u(F)gg
u(F)gu(F)c(F)gggu(F)gc(F)au(F)ac(F)-idT

5

CUADRO 5

**Resultados del experimento de inhibición de la adherencia de órganos usando el
modelo de ratón**

Administración	Puntuación
Solución salina fisiológica	3.0 +/- 0.0
SEQ ID NO: 76	2.4 +/- 0.3*

10

*; p<0.05, prueba U de Mann-Whitney.

Esta solicitud se basa en la solicitud de patente No. 2006-308482
presentada en Japón (fecha de presentación: noviembre 14 de 2006), cuyo contenido
se incorpora en su totalidad en la presente como referencia.

NOVEDAD DE LA INVENCION

REIVINDICACIONES

- 5 1.- Un aptámero que posee una actividad inhibidora contra midcina.
- 2.- El aptámero de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado además porque el aptámero no posee una actividad inhibidora contra pleiotrofina.
- 3.- El aptámero de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado además porque posee una actividad de unión al fragmento N-terminal de midcina.
- 10 4.- El aptámero de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado además porque posee una actividad de unión al fragmento C-terminal de midcina.
- 5.- El aptámero de conformidad con la reivindicación 2, caracterizado además porque posee una actividad de unión al fragmento N-terminal de midcina.
- 6.- El aptámero de conformidad con la reivindicación 2, caracterizado además porque posee una actividad de unión al fragmento C-terminal de midcina.
- 15 7.- Un aptámero que exhibe una actividad inhibidora contra midcina, inhibiendo la unión de midcina y PTP□.
- 8.- El aptámero de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado además porque es cualquiera de los incisos (a) o (b) siguientes: (a) un aptámero que
- 20 comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada de entre SEQ ID NO: 1 a 70 (con la condición de que el uracilo pueda ser timina), en donde los nucleótidos contenidos en el aptámero son tales que, (i) las posiciones 2' de los nucleótidos de pirimidina, ya sea idénticos o diferentes, son átomos de flúor o sustituidos por átomos o grupos seleccionados del grupo que consiste de átomos de hidrógeno, grupos hidroxí y
- 25 grupos metoxi, y (ii) las posiciones 2' de los nucleótidos de purina, ya sea idénticos o diferentes, son grupos hidroxí o sustituidos por átomos o grupos seleccionados del grupo que consiste de átomos de hidrógeno, grupos metoxi y átomos de flúor; (b) un

aptámero que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada de entre SEQ ID NO: 1 a 70 (con la condición de que el uracilo pueda ser timina), en donde uno o varios nucleótidos son sustituidos, deletados, insertados o añadidos, en donde los nucleótidos contenidos en el aptámero son tales que, (i) las posiciones 2' de los nucleótidos de pirimidina, ya sea idénticos o diferentes, son átomos de flúor o sustituidos por átomos o grupos seleccionados del grupo que consiste de átomos de hidrógeno, grupos hidroxilo y grupos metoxi, y (ii) las posiciones 2' de los nucleótidos de purina, ya sea idénticos o diferentes, son grupos hidroxilo o sustituidos por átomos o grupos seleccionados del grupo que consiste de átomos de hidrógeno, grupos metoxi y átomos de flúor.

10 9.- El aptámero de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado además porque un nucleótido contenido en el aptámero es modificado.

10.- Un complejo que comprende el aptámero de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 y una sustancia funcional.

15 11.- El complejo de conformidad con la reivindicación 10, caracterizado además porque la sustancia funcional es una sustancia de afinidad, una sustancia para marcación, una enzima, un vehículo de suministro de fármacos o un fármaco.

12.- Un fármaco farmacéutico que comprende el aptámero de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 o el complejo de las reivindicaciones 10 u 11.

20 13.- Un inhibidor de migración celular que comprende el aptámero de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 o el complejo de las reivindicaciones 10 u 11.

14.- Un reactivo de diagnóstico que comprende el aptámero de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 o el complejo de las reivindicaciones 10 u 11.

15.- Un agente de marcación que comprende el aptámero de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 o el complejo las reivindicaciones 10 u 11.

25 16.- Un método para detectar el aptámero de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 o el complejo de las reivindicaciones 10 u 11.

RESUMEN DE LA INVENCION

Se provee un aptámero de alta calidad contra midcina; un aptámero que posee una actividad inhibidora contra midcina; un complejo que comprende un aptámero que posee una actividad de unión o actividad inhibidora contra midcina, y una sustancia funcional, por ejemplo, sustancias de afinidad, sustancias para marcación, enzimas, vehículos de suministro de fármacos, fármacos, y similares; un fármaco farmacéutico, inhibidor de la migración celular, reactivo de diagnóstico, agente de marcación, y similares, que comprende un aptámero que posee una actividad de unión o actividad inhibidora contra midcina, o un complejo que comprende el aptámero y una sustancia funcional; un inhibidor de la migración celular, un reactivo de diagnóstico, un agente de marcación, y similares.

15

20

18B

P09/650F

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> RIBOMIC INC.
<120> APTAMER AGAINST MIDKINE AND USE THEREOF
<130> 091160
<150> JP 2006-308482
<151> 2006-11-14
<160> 76
<170> PatentIn version 3.3
<210> 1
<211> 77
<212> RNA
<213> Artificial
<220>
<223> Aptamer to midkine
<400> 1
\$gagaggag aagaggaaau aguaaagggu gaauuugcga aagcuuuuu agucgcagua 60
gaggacagga augagga 77
<210> 2
<211> 77
<212> RNA
<213> Artificial
<220>
<223> Aptamer to midkine
<400> 2
\$gagaggag aagagggaagg acuaaguaag agaacaccgg aaugaaggga cuuacgugua 60
gaggacagga augagga 77
<210> 3
<211> 75
<212> RNA
<213> Artificial
<220>
<223> Aptamer to midkine
<400> 3
\$gagaggag aagaggaaag ccuucuaccg aaagugggaa agcacacaua aaucugguag 60
aggacaggaa ugaga 75
<210> 4
<211> 76
<212> RNA
<213> Artificial
<220>
<223> Aptamer to midkine
<400> 4
\$gagaggag aagaggaaag ugcucuguac gaggaguagc cggaaagaag goggugugua 60
gaggacagga augaga 76
<210> 5
<211> 76
<212> RNA

<213> Artificial

<220>

<223> Aptamer to midkine

<400> 5
gggagaggag aagaggaagu gugcacaggg guuggugucg ggugcauaca guauaagaua 60
gaggacagga augaga 76

<210> 6
<211> 67
<212> RNA
<213> Artificial

<220>

<223> Aptamer to midkine

<400> 6
gggagaggag aagaggaacg ugcucuguac gaggaguagc cggaaagaag gcggugugua 60
gaggaca 67

<210> 7
<211> 64
<212> RNA
<213> Artificial

<220>

<223> Aptamer to midkine

<400> 7
gggaacgugc ucuguacgag gaguagccgg aaagaaggcg guguguagag gacaggaaug 60
agga 64

<210> 8
<211> 69
<212> RNA
<213> Artificial

<220>

<223> Aptamer to midkine

<400> 8
gggagaggag aagaggaacg cuguacgagg aguagccgga aagaaggcgg uguguagcag 60
gaaugagga 69

<210> 9
<211> 66
<212> RNA
<213> Artificial

<220>

<223> Aptamer to midkine

<400> 9
gggagaggag aagaggaacg ugcucuguac gccggaaaga agguguguag aggacaggaa 60
ugagga 66

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

<220>

<223> Aptamer to midkine

<400> 10
gggagaggag aagaggaacg ugcucuguac gaggaguagc cgaaaggcgg uguguagagg 60
acaggaauga gga 73

<210> 11
<211> 77
<212> RNA
<213> Artificial

<220>
<223> Aptamer to midkine

<400> 11
gggagaggag aagaggaacg ugcucugcac gaggaguagc cggaagaag gcggcgugca 60
gaggacagga augagga 77

<210> 12
<211> 58
<212> RNA
<213> Artificial

<220>
<223> Aptamer to midkine

<400> 12
gggagaggag aagaggaacg cugcacgagg aguagccgga aagaaggcgg cgugcagc 58

<210> 13
<211> 50
<212> RNA
<213> Artificial

<220>
<223> Aptamer to midkine

<400> 13
gggagaggaa cgcugcacga ggaguagccg gaaagaaggc ggcgugcagc 50

<210> 14
<211> 54
<212> RNA
<213> Artificial

<220>
<223> Aptamer to midkine

<400> 14
gggagaggag aagaggaacg cuacgaggag uagccggaaa gaaggcggcg uagc 54

<210> 15
<211> 56
<212> RNA
<213> Artificial

<220>
<223> Aptamer to midkine

<400> 15
gggagaggag aagaggaacg cugcacgagg aguagccgga aaggcggcg ugcagc 56

<210> 16
<211> 57
<212> RNA
<213> Artificial

<220>
 <223> Aptamer to midkine

<400> 16
 gggagaggag aagaggaacg cugcacgagg guagccggaa agaaggcggc gugcagc 57

<210> 17
 <211> 46
 <212> RNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Aptamer to midkine

<400> 17
 gggagaggaa cgcuaagagg aguagccgga aagaaggcgg cguagc 46

<210> 18
 <211> 37
 <212> RNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Aptamer to midkine

<400> 18
 gggcuacgag gaguagccgg aaagaaggcg gcguagc 37

<210> 19
 <211> 44
 <212> RNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Aptamer to midkine

<400> 19
 gggagaggaa cguacaggga guagccggaa agaaggcggc guac 44

<210> 20
 <211> 42
 <212> RNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Aptamer to midkine

<400> 20
 gggagaggaa cgaagaggag uagccggaaa gaaggcggcg uc 42

<210> 21
 <211> 44
 <212> RNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Aptamer to midkine

<400> 21
 gggagaggaa cgcuaagagg aguagccgga aagaaggcgg uagc 44

<210> 22
 <211> 33
 <212> RNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Aptamer to midkine

<400> 22
gggacgagga guagcggaa agaaggcggc guc 33

<210> 23
<211> 38
<212> RNA
<213> Artificial

<220>
<223> Aptamer to midkine

<400> 23
gggagaggaa cgacgaggag uagccgaaag gcggcguc 38

<210> 24
<211> 38
<212> RNA
<213> Artificial

<220>
<223> Aptamer to midkine

<400> 24
gggagaggaa cgacgaggag uagccuucgg gcggcguc 38

<210> 25
<211> 41
<212> RNA
<213> Artificial

<220>
<223> Aptamer to midkine

<400> 25
gggagaggaa cgacgagaac agccgaaag aaggcggcgu c 41

<210> 26
<211> 41
<212> RNA
<213> Artificial

<220>
<223> Aptamer to midkine

<400> 26
gggagaggaa cgacgagagu agccgaaag aaggcggcgu c 41

<210> 27
<211> 41
<212> RNA
<213> Artificial

<220>
<223> Aptamer to midkine

<400> 27
gggagaggaa cgacgagggu agccgaaag aaggcggcgu c 41

<210> 28
<211> 31
<212> RNA
<213> Artificial

<220>
<223> Aptamer to midkine

<400> 28

ggcgaggagu agccggaaag aaggcggcgc c 31

<210> 29
 <211> 31
 <212> RNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Aptamer to midkine

<400> 29
 gacgaggagu agccggaaag aaggcggcgu c 31

<210> 30
 <211> 71
 <212> RNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Aptamer to midkine

<400> 30
 ggagaagagg aagugugcac agggguuggu gucgggugca uacaguauaa gauagaggac 60
 aggaugagg a 71

<210> 31
 <211> 67
 <212> RNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Aptamer to midkine

<400> 31
 ggagaggag aagaggaagu gugcacaggg guuggugucg ggugcauaca guauaagaua 60
 gaggaca 67

<210> 32
 <211> 57
 <212> RNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Aptamer to midkine

<400> 32
 ggagaggag aagaggaagu gugcacaggg guuggugucg ggugcauaca guauaag 57

<210> 33
 <211> 61
 <212> RNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Aptamer to midkine

<400> 33
 ggagaagagg aagugugcac agggguuggu gucgggugca uacaguauaa gauagaggac 60
 a 61

<210> 34
 <211> 46
 <212> RNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Aptamer to midkine

 <400> 34
 ggaggaagug ugcacagggg uggugucgg gugcauacag uauaag 46

 <210> 35
 <211> 51
 <212> RNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Aptamer to midkine

 <400> 35
 ggagaggag aagaggaagu ggcacaggg guugugucg ggugcauaca g 51

 <210> 36
 <211> 53
 <212> RNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Aptamer to midkine

 <400> 36
 ggagaggag aagaggaagu gcacaggggu uggugucgg ugcacaguau aag 53

 <210> 37
 <211> 49
 <212> RNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Aptamer to midkine

 <400> 37
 ggagaggag aagaggaagc acagggguug gugucggug caguauaag 49

 <210> 38
 <211> 57
 <212> RNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Aptamer to midkine

 <400> 38
 ggguuuuuuu uuuuuuuugu ggcacaggg guugugucg ggugcauaca guauaag 57

 <210> 39
 <211> 45
 <212> RNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Aptamer to midkine

 <400> 39
 ggagaggag aagaggaagg cacagggguu ggugucgggu gccag 45

 <210> 40
 <211> 49
 <212> RNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Aptamer to midkine

<400> 40
gggagaggag aagaggaagu gugcacaggg guugugugcg ggugcauac 49

<210> 41
<211> 52
<212> RNA
<213> Artificial

<220>
<223> Aptamer to midkine

<400> 41
gggaaggaga agaggaagug cacagggguu ggugucgggu gcacaguaua ag 52

<210> 42
<211> 52
<212> RNA
<213> Artificial

<220>
<223> Aptamer to midkine

<400> 42
gggagaggag agaggaagug cacagggguu ggugucgggu gcacaguaua ag 52

<210> 43
<211> 52
<212> RNA
<213> Artificial

<220>
<223> Aptamer to midkine

<400> 43
gggagaggag aagaggagug cacagggguu ggugucgggu gcacaguaua ag 52

<210> 44
<211> 47
<212> RNA
<213> Artificial

<220>
<223> Aptamer to midkine

<400> 44
gggagaggag aagaggaagu ugcacagggg uggugucggg gugcaac 47

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

<220>
<223> Aptamer to midkine

<400> 45
gggagaggag aagaggaagu gcacaggggu uggugucggg ugcac 45

<210> 46
<211> 49
<212> RNA
<213> Artificial

<220>
<223> Aptamer to midkine

<400> 46

gggagaggag aagaggaagu gcgcgcaggg guugguugucg ggcgcguac 49

<210> 47
<211> 48
<212> RNA
<213> Artificial

<220>
<223> Aptamer to midkine

<400> 47
gggagaggag aagaggaagu ggcacaggg guugguugcg ggcgauac 48

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

<220>
<223> Aptamer to midkine

<400> 48
gggagaggag aagaggaagu ggcacaggg guugguugcg ggcgauac 48

<210> 49
<211> 48
<212> RNA
<213> Artificial

<220>
<223> Aptamer to midkine

<400> 49
gggagaggag aagaggaagu ggcacaggg guugguugcg ggcgauac 48

<210> 50
<211> 43
<212> RNA
<213> Artificial

<220>
<223> Aptamer to midkine

<400> 50
gggaaggaaa gaggaagugc acagggguug gugucgggug cac 43

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

<220>
<223> Aptamer to midkine

<400> 51
gggaaggaga gaggaagugc acagggguug gugucgggug cacaguauaa g 51

<210> 52
<211> 51
<212> RNA
<213> Artificial

<220>
<223> Aptamer to midkine

<400> 52
gggaaggagaa gaggaagugc acagggguug gugucgggug cacaguauaa g 51

<210> 53
<211> 51
<212> RNA
<213> Artificial

<220>
<223> Aptamer to midkine

<400> 53
gggaaggaaa gaggaagugc acagggguug gugucgggug cacaguauaa g 51

<210> 54
<211> 45
<212> RNA
<213> Artificial

<220>
<223> Aptamer to midkine

<400> 54
gggagaggag aagaggaagu gcacaggggu ugugucggg ugacac 45

<210> 55
<211> 43
<212> RNA
<213> Artificial

<220>
<223> Aptamer to midkine

<400> 55
gggagaggag gaggaagugc acagggguug gugucgggug cac 43

<210> 56
<211> 43
<212> RNA
<213> Artificial

<220>
<223> Aptamer to midkine

<400> 56
gggagaggag aaggaagugc acagggguug gugucgggug cac 43

<210> 57
<211> 43
<212> RNA
<213> Artificial

<220>
<223> Aptamer to midkine

<400> 57
gggagaggag aagaaagugc acagggguug gugucgggug cac 43

<210> 58
<211> 43
<212> RNA
<213> Artificial

<220>
<223> Aptamer to midkine

<400> 58
gggagaggag aagaggugc acagggguug gugucgggug cac 43

<210> 59

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

<220>
<223> Aptamer to midkine

<400> 59
gggugcacag ggguggugu cgggugcac

29

<210> 60
<211> 35
<212> RNA
<213> Artificial

<220>
<223> Aptamer to midkine

<400> 60
gggaaggagu gcacagggu uggugucggg ugcac

35

<210> 61
<211> 39
<212> RNA
<213> Artificial

<220>
<223> Aptamer to midkine

<400> 61
gggaaggagg aagugcacag ggguggugu cgggugcac

39

<210> 62
<211> 39
<212> RNA
<213> Artificial

<220>
<223> Aptamer to midkine

<400> 62
gggagaggag aagugcacag ggguggugu cgggugcac

39

<210> 63
<211> 45
<212> RNA
<213> Artificial

<220>
<223> Aptamer to midkine

<400> 63
gggagaggag aagaggaagu gcacccgggu uggugucggg ugcac

45

<210> 64
<211> 37
<212> RNA
<213> Artificial

<220>
<223> Aptamer to midkine

<400> 64
gggaaggagg aaggcacagg gguugguguc ggugucc

37

<210> 65
<211> 39
<212> RNA

<213> Artificial
 <220>
 <223> Aptamer to midkine
 <400> 65
 gggaaggagg aagugcaccc gguuggugu cgggugcac 39

 <210> 66
 <211> 38
 <212> RNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Aptamer to midkine
 <400> 66
 ggaaggagga agugcacagg gguugguguc gggugcac 38

 <210> 67
 <211> 38
 <212> RNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Aptamer to midkine
 <400> 67
 ggaaggagga agugcacagg gguugguguc gggugcac 38

 <210> 68
 <211> 39
 <212> RNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Aptamer to midkine
 <400> 68
 gggaaggagg aagugcacag gguuggagu cgggugcac 39

 <210> 69
 <211> 39
 <212> RNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Aptamer to midkine
 <400> 69
 gggaaggagg aagugcacag gguaggugu cgggugcac 39

 <210> 70
 <211> 39
 <212> RNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Aptamer to midkine
 <400> 70
 gggaaggagg aagugcacag gggauggugu cgggugcac 39

 <210> 71
 <211> 77
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
<223> DNA template for producing aptamer to midkine

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

<220>
<221> misc_feature
<222> (20)..(59)
<223> n is a, c, g, or t

<400> 71
tcctcattcc tgcctctctan nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnnt 60
tcctctctctc ctctccc 77

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

<220>
<223> primer for producing aptamer to midkine

<400> 72
taatacgact cactataggg agaggagaag aggaa 35

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

<220>
<223> reverse primer for producing aptamer to midkine

<400> 73
tcctcattcc tgcctctta 19

<210> 74
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> DNA aptamer to thrombin (Thrombin-S)

<400> 74
tggttggtgt gggttggttaa aaaaaaaaaa aaa 33

<210> 75
<211> 17
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> DNA aptamer to HIV (HIV-S)

<400> 75
gtggtgggtg ggtgggt 17

<210> 76
<211> 49
<212> RNA
<213> Artificial

<220>
<223> Aptamer to midkine

<400> 76
gggagaggag aagaggaagu gugcacaggg guuggugucg ggugcauac

49

FIG. 1B

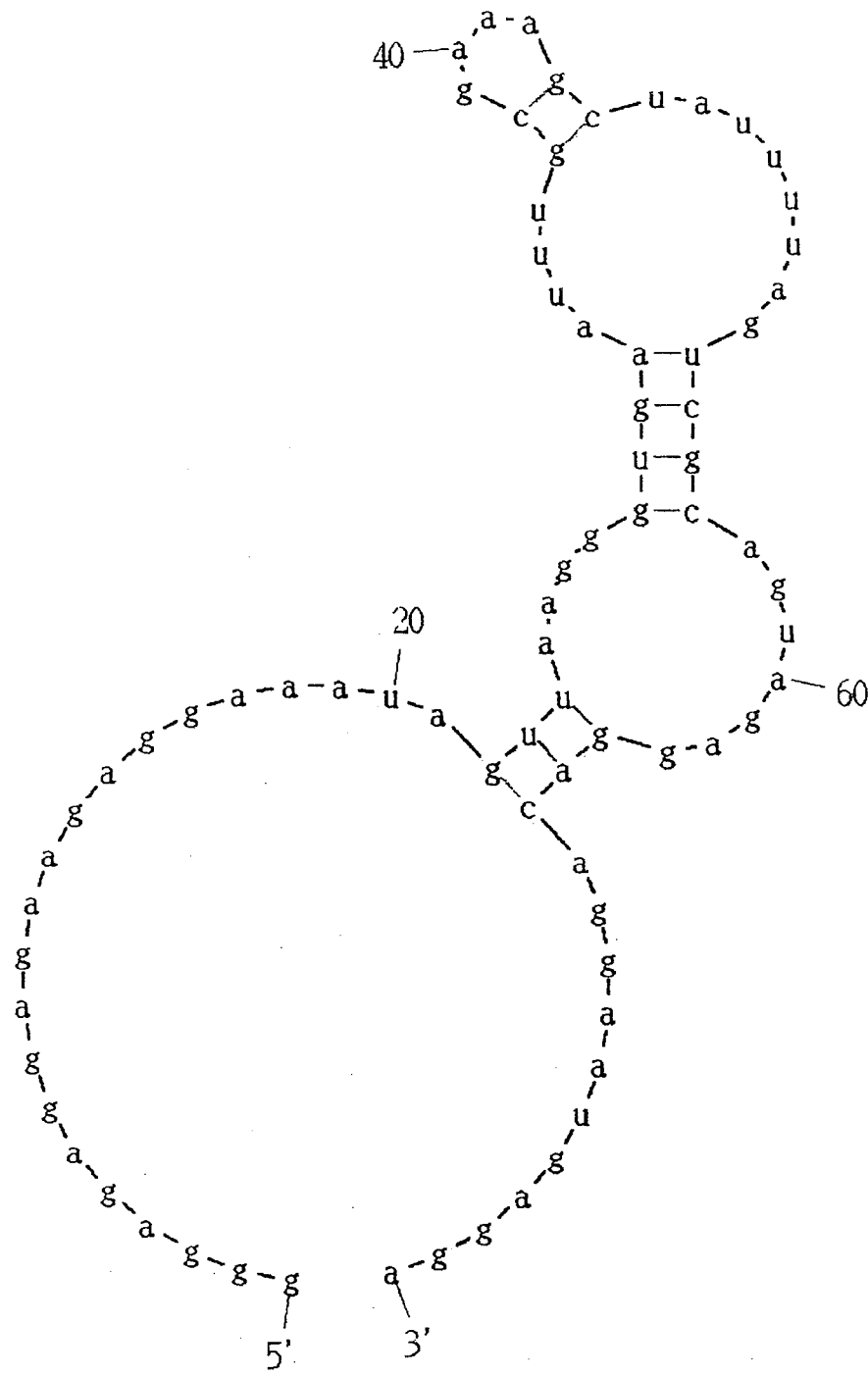
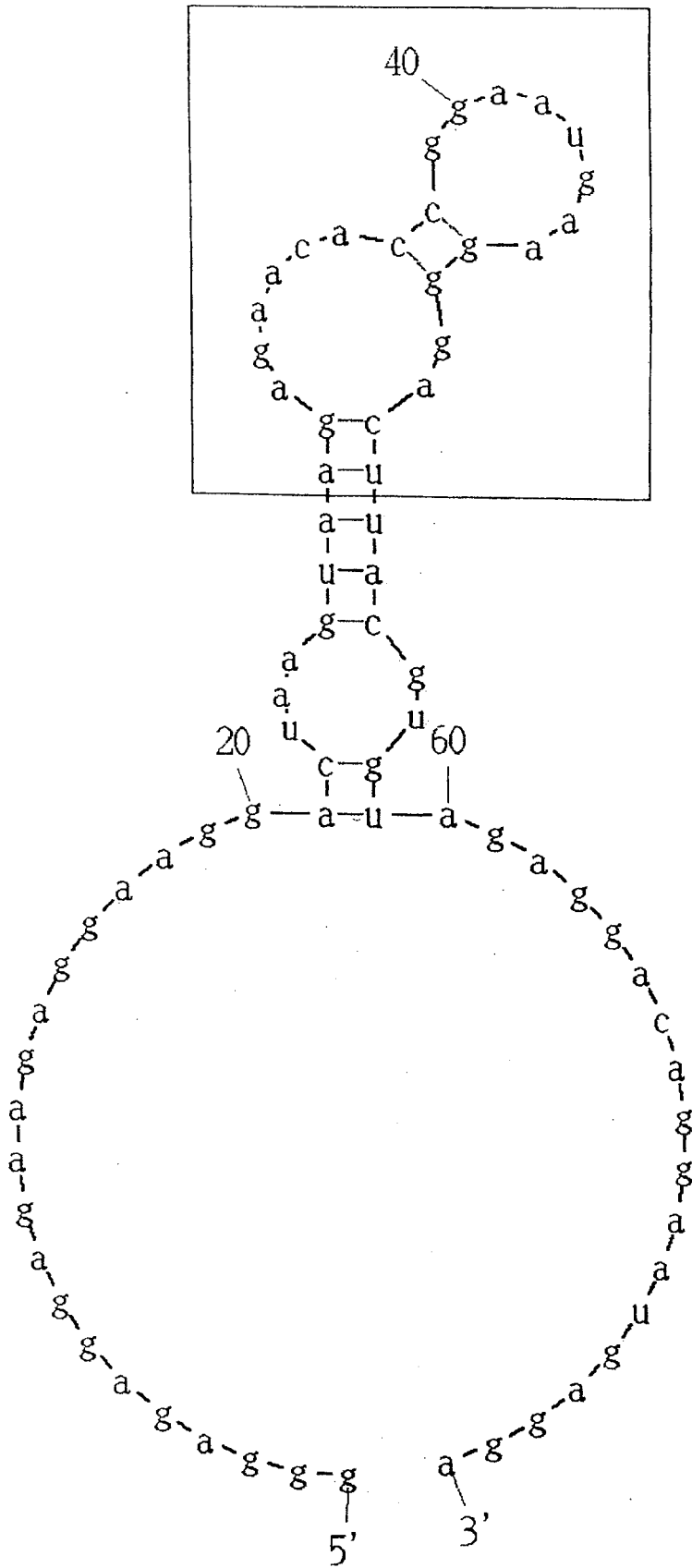
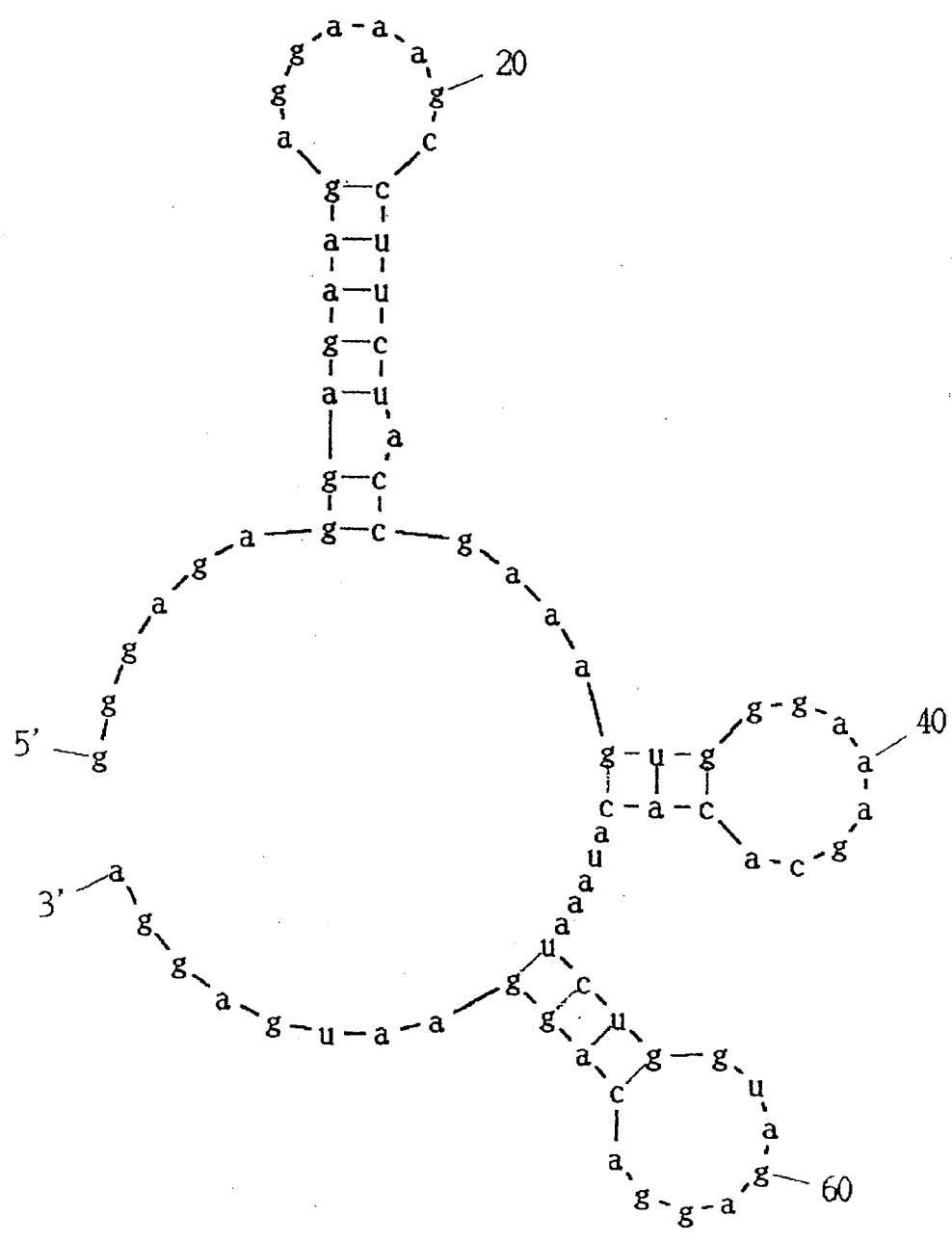


FIG. 2A



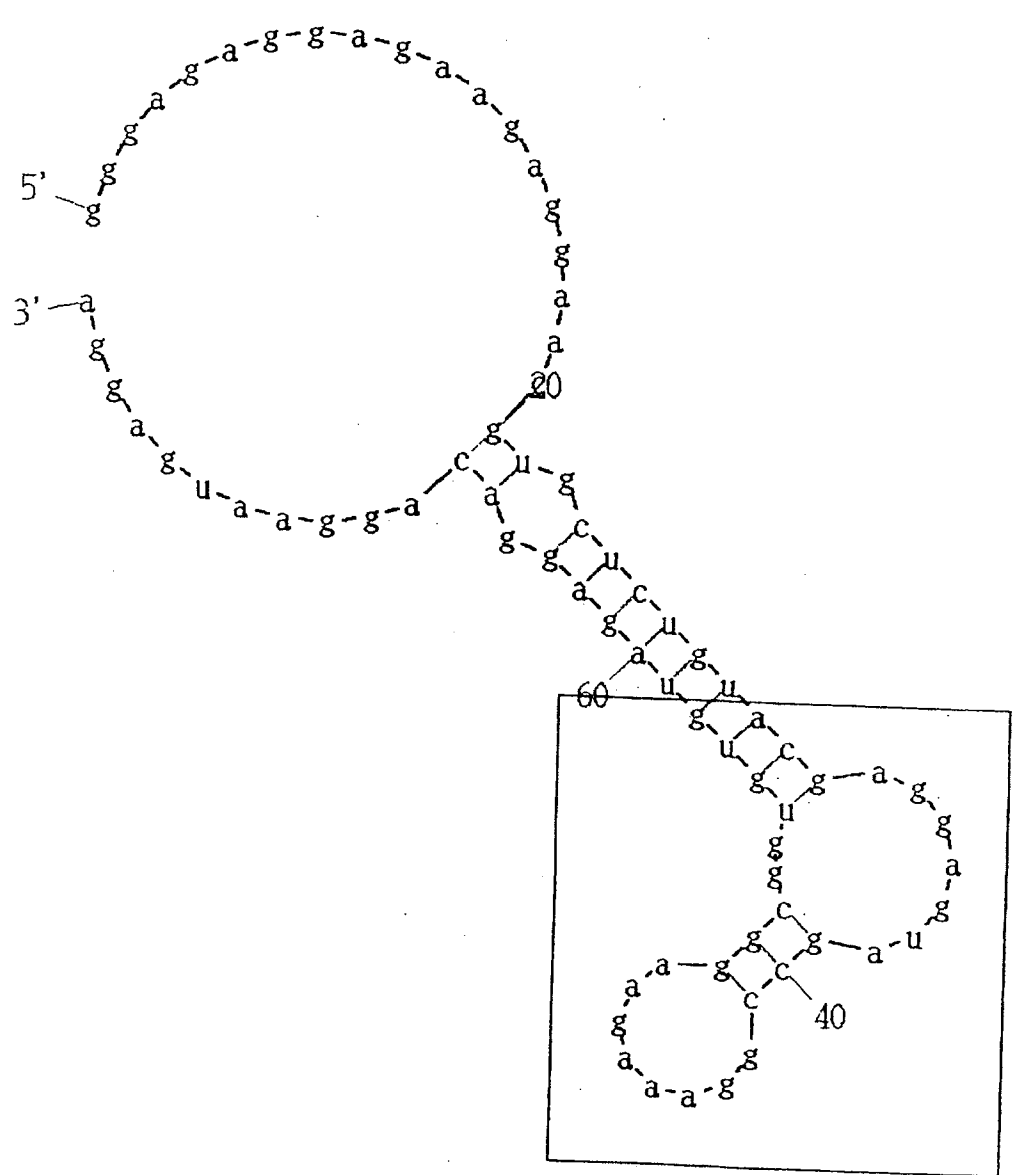
5/12

FIG. 3A



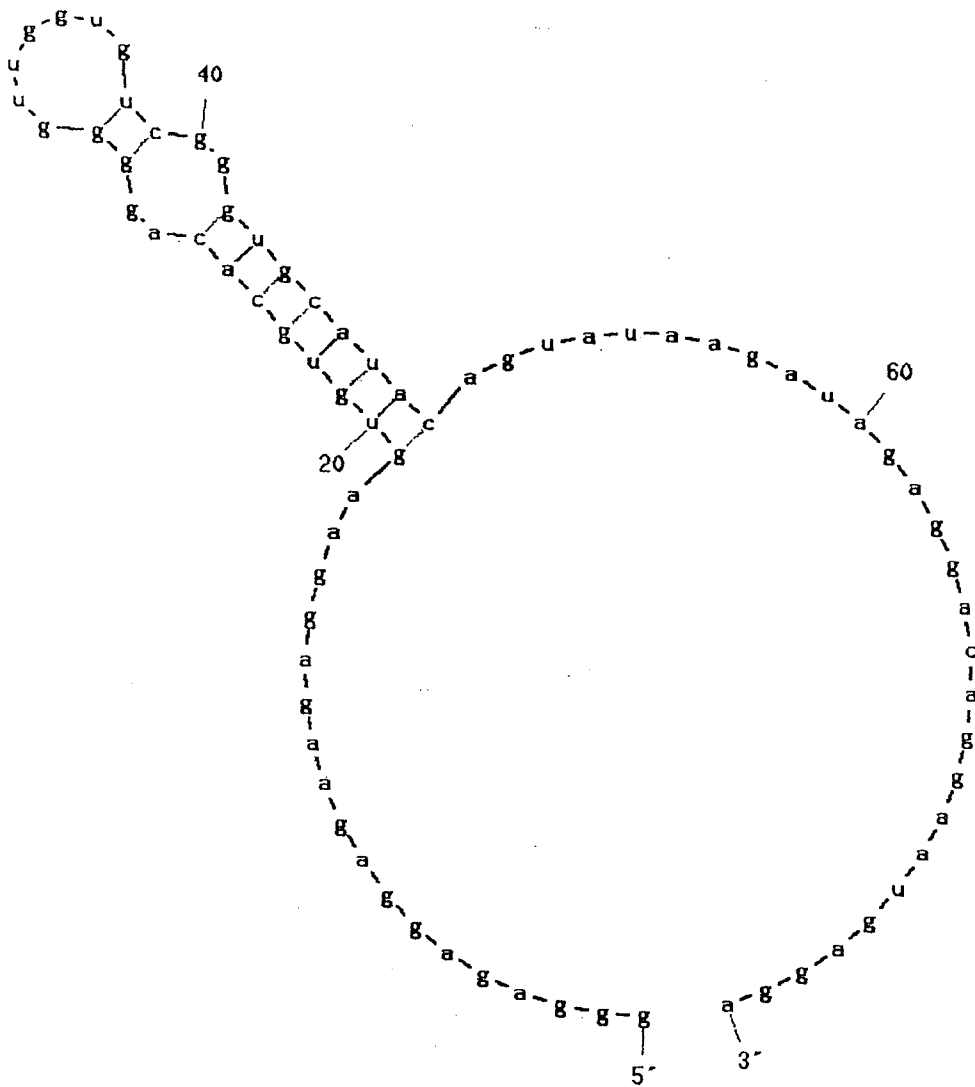
7/12

FIG. 4



8/12

FIG. 5



9/12

FIG. 6

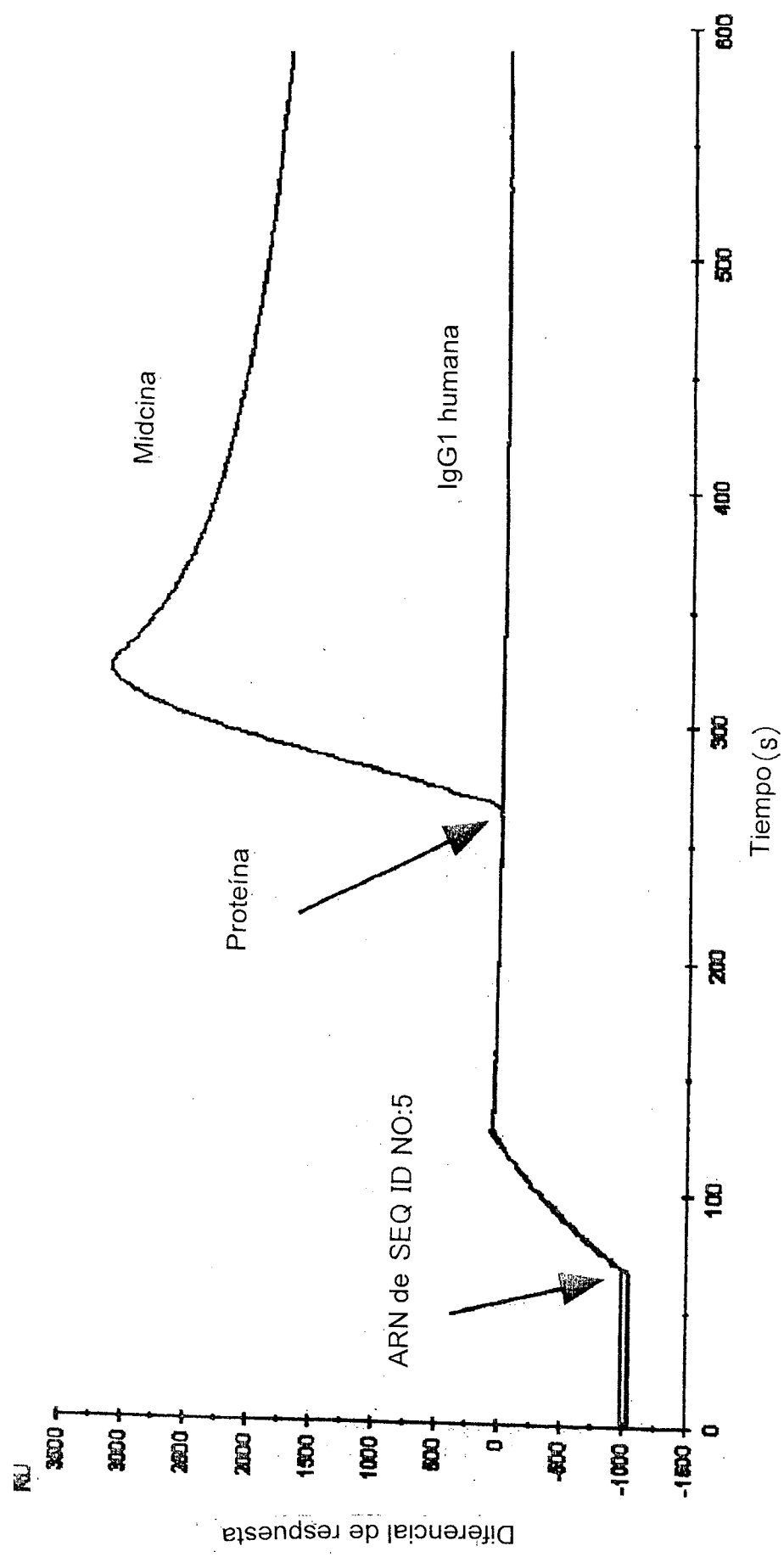


FIG. 7

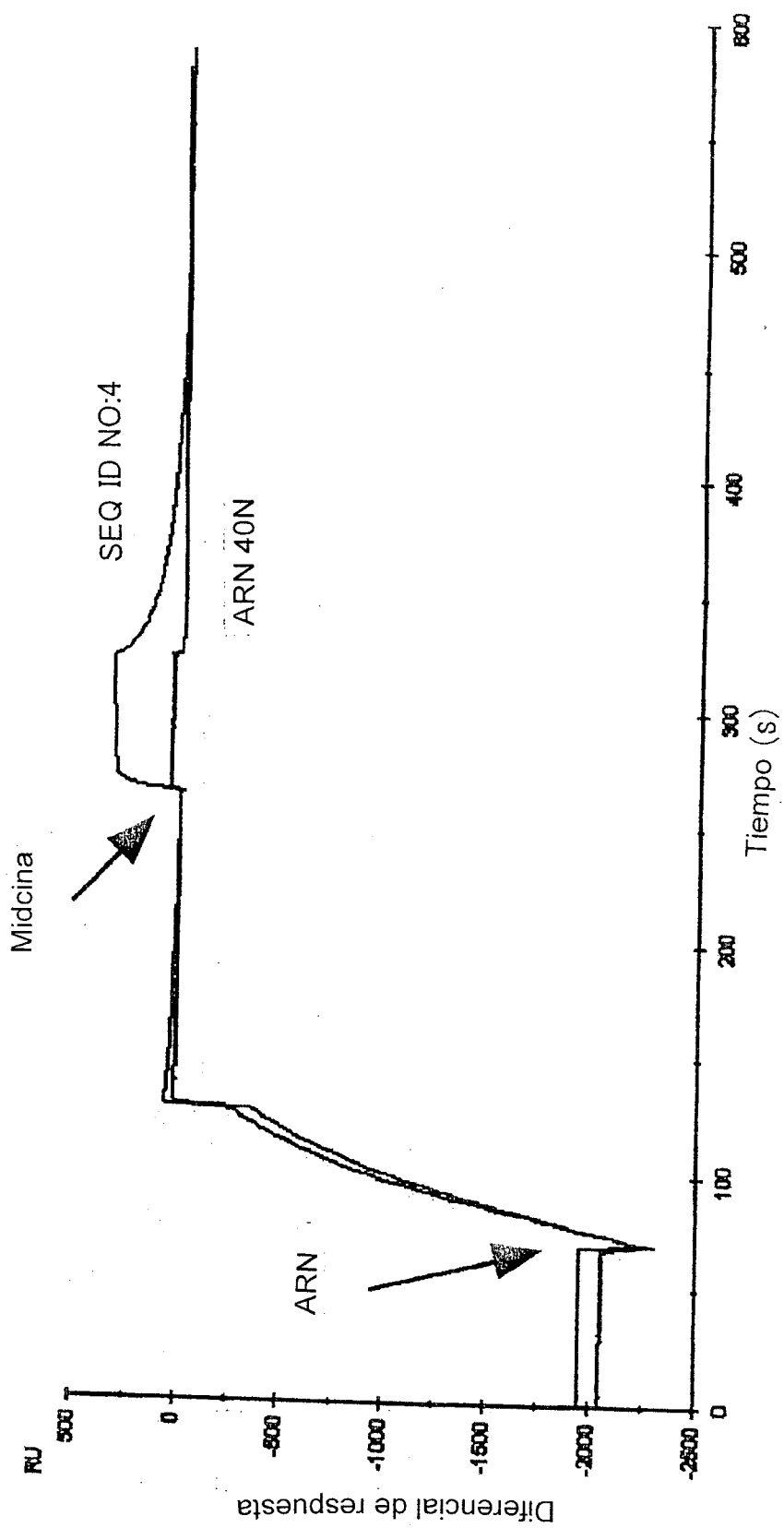
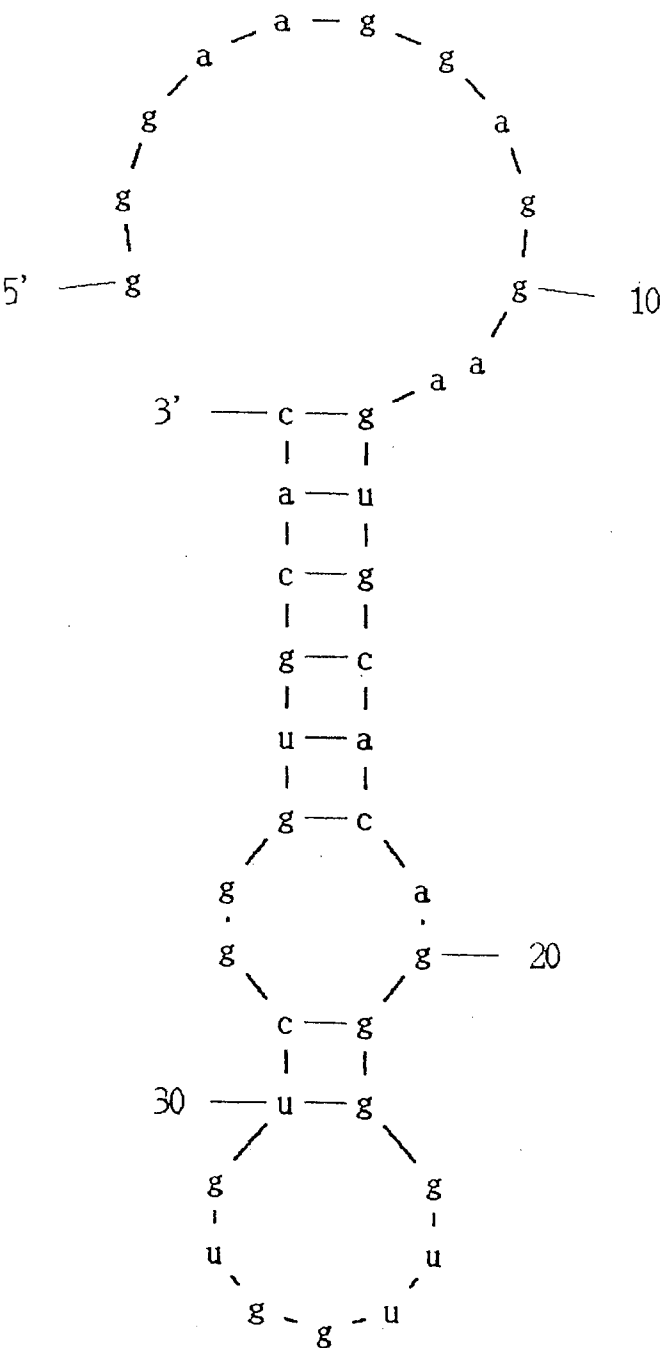


FIG. 9





Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

TARJETA ARCHIVO PROPIETARIOS

SUPERINTENDENCIA PATENTE DE INVENCION PCT X MODELO DE UTILIDAD DISEÑO INDUSTRIAL

(21) N° de solicitud:

(22) Fecha de solicitud:

(51) Clasificación Internacional :

(71) Solicitante(s) **RIBOMIC INC.**

(72) Inventor(es) **SHIN MIYAKAWA, MASATOSHI FUJIWARA, YOSHIKAZU NAKAMURA, TAKASHI MATSUI, SADATOSHI SAKUMA**

(74) Apoderado: **DRA. MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO**

(30) Prioridad

(31) No. Prioridad

32)

Fecha

(33)

País

2006-308482

14/11/2006

JP

(85) Fecha inicio fase nacional:

(87) Publicación internacional

(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT

Fecha: **22/05/2008**

Fecha de presentación de la solicitud: **14/11/2007**

N° publicación: **WO 2008/059877 A1**

No. de solicitud **PCT/JP2007/072099**

(54) Título: **APTAMERO CONTRA MIDCINA Y USO DEL MISMO**

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES
EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN
SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT

(21) N° de solicitud:		(51) int. Cl.:	
22) Fecha de solicitud:		(71) Solicitante(s) RIBOMIC INC	
(30) Prioridad	(31) N° Prioridad 2006-308482	32) Fecha 14/11/2006	(33) País JP
		(72) Inventor(es) SHIN MIYAKAWA MASATOSHI FUJIWARA Y OTROS	
		(74) Apoderado: MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO	
(85)	Fecha limite inicio fase nacional:	(87) Publicación internacional	
(86)	Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT	Fecha: 22/05/2008	
	Fecha de presentación de la solicitud: 14/11/2007	N° publicación: WO/2008/059877 A1	
	N° de solicitud PCT/JP2007/072099		
(54) Título: APTAMERO CONTRA MIDCINA Y USO DEL MISMO			

Reivindicación(es):

- 1.- Un aptámero que posee una actividad inhibidora contra midcina.
- 2.- El aptámero de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado además porque el aptámero no posee una actividad inhibidora contra pleiotrofina.
- 3.- El aptámero de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado además porque posee una actividad de unión al fragmento N-terminal de midcina.
- 4.- El aptámero de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado además porque posee una actividad de unión al fragmento C-terminal de midcina.
- 5.- El aptámero de conformidad con la reivindicación 2, caracterizado además porque posee una actividad de unión al fragmento N-terminal de midcina.
- 6.- El aptámero de conformidad con la reivindicación 2, caracterizado además porque posee una actividad de unión al fragmento C-terminal de midcina.
- 7.- Un aptámero que exhibe una actividad inhibidora contra midcina, inhibiendo la unión de midcina y PTP1.
- 8.- El aptámero de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado además porque es cualquiera de los incisos (a) o (b) siguientes: (a) un aptámero que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada de entre SEQ ID NO: 1 a 70 (con la condición de que el uracilo pueda ser timina), en donde los nucleótidos contenidos en el aptámero son tales que, (i) las posiciones 2' de los nucleótidos de pirimidina, ya sea idénticos o diferentes, son átomos de flúor o sustituidos por átomos o grupos seleccionados del grupo que consiste de átomos de hidrógeno, grupos hidroxí y grupos metoxi, y (ii) las posiciones 2' de los nucleótidos de purina, ya sea idénticos o diferentes, son grupos hidroxí o sustituidos por átomos o grupos seleccionados del grupo que consiste de átomos de hidrógeno, grupos metoxi y átomos de flúor; (b) un aptámero que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada de entre SEQ ID NO: 1 a 70 (con la condición de que el uracilo pueda ser timina), en donde uno o varios nucleótidos son sustituidos, deletados, insertados o añadidos, en donde los nucleótidos contenidos en el aptámero son tales que, (i) las posiciones 2' de los nucleótidos de pirimidina, ya sea idénticos o diferentes, son átomos de flúor o sustituidos por átomos o grupos seleccionados del grupo que consiste de átomos de hidrógeno, grupos hidroxí y grupos metoxi, y (ii) las posiciones 2' de los nucleótidos de purina, ya sea idénticos o diferentes, son grupos hidroxí o sustituidos por átomos o grupos seleccionados del grupo que consiste de átomos de

hidrógeno, grupos metoxi y átomos de flúor.

- 9.- El aptámero de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado además porque un nucleótido contenido en el aptámero es modificado.
- 10.- Un complejo que comprende el aptámero de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 y una sustancia funcional.
- 11.- El complejo de conformidad con la reivindicación 10, caracterizado además porque la sustancia funcional es una sustancia de afinidad, una sustancia para marcación, una enzima, un vehículo de suministro de fármacos o un fármaco.
- 12.- Un fármaco farmacéutico que comprende el aptámero de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 o el complejo de las reivindicaciones 10 u 11.
- 13.- Un inhibidor de migración celular que comprende el aptámero de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 o el complejo de las reivindicaciones 10 u 11.
- 14.- Un reactivo de diagnóstico que comprende el aptámero de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 o el complejo de las reivindicaciones 10 u 11.
- 15.- Un agente de marcación que comprende el aptámero de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 o el complejo de las reivindicaciones 10 u 11.
- 16.- Un método para detectar el aptámero de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 o el complejo de las reivindicaciones 10 u 11.

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá,
2020

Doctor(a)
MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO

REFERENCIA	Radicación No.	09 54211
	Solicitud internacional	PCT/JP2007/072099
	Fecha inicio fase nacional	14/06/2009
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	7110

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 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.

2. 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, conforme a lo establecido por el artículo 26 literal k) de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina. Cuando se trate de documentos otorgados en el extranjero, estos deberán legalizarse de conformidad con lo dispuesto por los artículos 259 y 260 del Código de Procedimiento Civil. Cuando se trate de las declaraciones a que hace referencia la Regla 4.17 ii) del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes PCT., el alcance de las tales declaraciones se determinará según indiquen claramente una cesión de derechos del inventor al solicitante o su causante, de conformidad con lo dispuesto en el numeral 5.2.15 del Capítulo Quinto, Título X de la Circular Única de Superintendencia de Industria y Comercio.

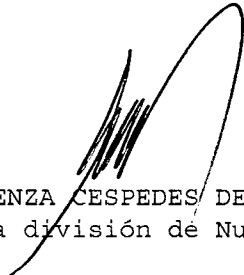
En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud 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 Única No.10 de 2001.

Continúa en la página siguiente...

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Radicación No.: 9 54211



ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de
fecha 26 JUN. 2009
jfernand