



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 112020026634-5 A2



(22) Data do Depósito: 28/06/2019

(43) Data da Publicação Nacional: 06/04/2021

(54) Título: PREPARAÇÃO DE APTÂMERO

(51) Int. Cl.: A61K 48/00; A61K 9/08; A61K 31/7105; A61K 47/26; A61P 9/00; (...).

(30) Prioridade Unionista: 29/06/2018 JP 2018-124390.

(71) Depositante(es): RIBOMIC INC..

(72) Inventor(es): YOSHIKAZU NAKAMURA; KAZUMASA AKITA; YUSUF ALI.

(86) Pedido PCT: PCT JP2019025766 de 28/06/2019

(87) Publicação PCT: WO 2020/004607 de 02/01/2020

(85) Data da Fase Nacional: 23/12/2020

(57) Resumo: PREPARAÇÃO DE APTÂMERO. A presente invenção refere-se a formulação de uma preparação por meio da qual a atividade de um aptâmero, em particular, um aptâmero para FGF2 pode ser estavelmente mantida durante um longo período de tempo. Como um resultado também fornecida é uma preparação farmacêutica compreendendo um aptâmero, em particular, um aptâmero para FGF2 como um ingrediente ativo.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para
"PREPARAÇÃO DE APTÂMERO".

Campo da Técnica

[001] A presente invenção refere-se a uma preparação de aptâmero, particularmente uma preparação de aptâmero contendo um aptâmero para um fator de crescimento de fibroblasto básico (FGF2) como um ingrediente ativo.

Técnica Antecedente

[002] Nos últimos anos, aplicações de aptâmeros de RNA a medicamentos, reagentes de diagnóstico e reagentes de teste vêm chamando atenção e alguns aptâmeros de RNA já estavam no estágio de estudo clínico ou uso prático. O primeiro fármaco de aptâmero de RNA do mundo, Macugen (marca registrada) (nome geral: pegaptanibe sódico), foi aprovado como um fármaco terapêutico para a degeneração macular relacionada à idade em dezembro de 2004 nos EUA e em julho de 2008 no Japão. Macugen (marca registrada) contém um aptâmero contra VEGF como o organismo vivo. O aptâmero é composto de um oligonucleotídeo sintético consistindo em 28 moléculas de ácido nucleico e um derivado de polietilenoglicol (PEG) é ligado ao 5'-terminal do mesmo.

[003] A forma de dosagem de Macugen (marca registrada) é uma injeção com seringa pré-cheia e ela é injetada no corpo vítreo. A mesma é uma injeção aquosa que é incolor a levemente colorida e contém hidrogeno fosfato de sódio, di-hidrogeno fosfato de sódio, um agente isotônico e um ajustador de pH. Foi mostrado que esta formulação de preparação é estável por 6 meses em um teste acelerado a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ e por 36 meses em um teste de armazenamento a longo prazo a $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ (documento que não de patente 1).

[004] Por outro lado, no momento do depósito do presente pedido, não existiu nenhum produto farmacêutico exceto Macugen (marca

registrada) que contivesse um aptâmero como o ingrediente ativo e não se sabe de maneira alguma qual formulação de preparação é apropriada para as preparações de aptâmero.

[005] O Requerente está desenvolvendo um produto farmacêutico contendo um aptâmero para FGF2 como um ingrediente ativo e aplicável à degeneração macular relacionada à idade, acondroplasia e dor do câncer (documentos de patente 1 e 2). No processo de desenvolver uma preparação de aptâmero de FGF2, os presentes inventores obtiveram resultados de que uma formulação de preparação considerada ser quase a mesma como Macugen (marca registrada) e uma formulação de preparação contendo solução salina tamponada com fosfato (PBS) como um meio não podem manter a atividade do aptâmero de FGF2.

Lista de Documentos

Documentos de Patente

[006] documento de patente 1: WO 2011/099576

[007] documento de patente 2: WO 2015/147017

Documento de não patente

[008] documento de não patente 1: Pharmaceutical product interview form, age-related macular degeneration therapeutic agent Macugen (registered trade mark) intravitreal injection kit 0,3 mg, March 2015 (revised 5th edition)

Sumário da Invenção

Problema Técnico

[009] Portanto, a presente invenção visa fornecer uma formulação de preparação capaz de manter estavelmente a atividade de um aptâmero, particularmente um aptâmero para FGF2, por um longo prazo, fornecendo desse modo uma preparação farmacêutica contendo um aptâmero, particularmente um aptâmero de FGF2, como um ingrediente ativo.

Solução para o Problema

[010] Os presentes inventores conduziram estudos intensos em uma tentativa de obter o propósito mencionado acima e constataram condições de preparação ideais para o aptâmero de FGF2, o que resultou na conclusão da presente invenção.

[011] Conseqüentemente, a presente invenção fornece o seguinte.

[1] Um líquido aquoso compreendendo um aptâmero ou um sal do mesmo que se liga a FGF2 e um osmorregulador não eletrolítico, em que o aptâmero ou um sal do mesmo é estável por um longo prazo.

[2] O líquido aquoso de [1], em que o líquido é substancialmente livre de um eletrólito exceto o aptâmero anteriormente mencionado ou um sal do mesmo.

[3] O líquido aquoso de [1], em que o aptâmero anteriormente mencionado compreende uma sequência de nucleotídeo representada pela fórmula (1) seguinte (em que uracila é opcionalmente timina):



(em que N^1 e N^6 são todos independentemente quaisquer 0 a várias bases, e

N^2 , N^3 , N^4 e N^5 são independentemente qualquer uma base),

e é o (a) ou (b) seguinte:

(a) um aptâmero em que, nos nucleotídeos contidos no aptâmero,

(i) a posição 2' da ribose de cada nucleotídeo de pirimidina é um átomo de flúor,

(ii) a posição 2' da ribose de cada nucleotídeo de purina é um grupo hidróxi;

(b) o aptâmero de (a), em que

(i) o átomo de flúor na posição 2' da ribose de cada

nucleotídeo de pirimidina é independentemente não substituída, ou substituída por um átomo ou grupo selecionado a partir do grupo consistindo em um átomo de hidrogênio, um grupo hidróxi e um grupo metóxi,

(ii) o grupo hidróxi na posição 2' da ribose de cada nucleotídeo de purina é independentemente não substituído, ou substituído por um átomo ou grupo selecionado a partir do grupo consistindo em um átomo de hidrogênio, um grupo metóxi e um átomo de flúor.

[4] O líquido aquoso de [1] ou [2], em que o aptâmero anteriormente mencionado compreende uma sequência de nucleotídeo representada pela fórmula (3) seguinte:



(3)

(em que N¹ e N⁶² são todos independentemente quaisquer 0 a várias bases).

[5] O líquido aquoso de [1] ou [2], em que o aptâmero anteriormente mencionado compreende uma sequência de nucleotídeo mostrada na SEQ ID N^o: 3, 8, 9, 10 ou 12.

[6] O líquido aquoso de qualquer um de [1] a [5], em que o aptâmero tem uma concentração de 1 a 60 mg/mL.

[7] O líquido aquoso de qualquer um de [1] a [6], em que o osmorregulador é combinado em uma proporção de 2 a 7,5% (p/v) do líquido aquoso integral.

[8] O líquido aquoso de qualquer um de [1] a [7], em que o osmorregulador é manitol.

[9] O líquido aquoso de [8], em que o manitol é contido em 1 a 50 mg por 1 mg do aptâmero.

[10] O líquido aquoso de qualquer um de [1] a [9], em que o líquido é armazenado em não mais do que 5°C.

[11] O líquido aquoso de qualquer um de [1] a [10], em que uma proporção de um aptâmero monomérico é não menos do que 80% depois do armazenamento a 4°C por 3 meses.

[12] O líquido aquoso de qualquer um de [1] a [11], em que o líquido é uma injeção.

[13] O líquido aquoso de qualquer um de [1] a [12], em que o líquido é para prevenir ou tratar uma doença acompanhada por angiogênese, doença dos ossos ou cartilagens ou dor.

[14] Um método para prevenir ou tratar uma doença acompanhada por angiogênese, doença dos ossos ou cartilagens ou dor, compreendendo administrar o líquido aquoso de qualquer um de [1] a [12] a um indivíduo.

[15] O líquido aquoso de qualquer um de [1] a [12] para o uso na profilaxia ou tratamento de uma doença acompanhada por angiogênese, doença dos ossos ou cartilagens ou dor.

Efeitos Vantajosos da Invenção

[012] De acordo com a presente invenção, uma preparação de aptâmero facilmente manejável pode ser fornecida porque um aptâmero para FGF2 ou um sal do mesmo que é o ingrediente ativo pode ser estavelmente armazenada por um longo prazo na forma de um líquido aquoso.

Descrição das Modalidades

[013] A presente invenção fornece uma preparação farmacêutica contendo um aptâmero para FGF2 ou um sal do mesmo como um ingrediente ativo, em que o aptâmero ou um sal do mesmo é estavelmente mantido por um longo prazo (em seguida também referida como "a preparação de aptâmero da presente invenção"). Como usado aqui, "estável por um longo prazo" significa que a proporção de um aptâmero monomérico depois do armazenamento da preparação incluída em um frasco de vidro a 4°C por 3 meses é não menos do que

70%. A proporção do aptâmero monomérico é um valor obtido separando-se e detectando-se monômeros e multímeros por cromatografia de exclusão por tamanho sob as condições seguintes e calculando-se a $(\text{área de pico dos monômeros})/(\text{área de pico total de monômeros e multímeros}) \times 100(\%)$.

aparelho: ACQUITY UPLC H-Class Bio fabricado por Waters

detector: TUV detector fabricado por Waters

coluna: ACQUITY UPLC BEH200 SEC column fabricada por Waters

concentração da amostra: 0,2 mg/mL

volume de injeção: 5 μ L

eluente: 10% de acetonitrila/PBS

vazão: 0,3 mL/min

temperatura da coluna: 25°C

[014] A preparação de aptâmero da presente invenção contém um aptâmero para FGF2 ou um sal do mesmo como o ingrediente ativo e um osmorregulador que não de eletrólito.

[015] Um aptâmero se refere a uma molécula de ácido nucleico tendo uma atividade de ligação para uma molécula alvo particular. O aptâmero pode inibir a atividade de uma molécula alvo particular por ligação à molécula alvo. O aptâmero a ser o ingrediente ativo da preparação de aptâmero da presente invenção é um aptâmero tendo uma atividade de ligação a FGF2. Em uma modalidade preferida, o aptâmero é um aptâmero que pode se ligar a FGF2 e inibir a ligação entre o receptor de FGF2 e FGF. Isto é, o aptâmero tem uma atividade inibitória contra FGF2.

[016] O aptâmero usado na presente invenção é um aptâmero que se liga a FGF2 e ainda preferivelmente um aptâmero que pode se ligar a FGF2 e inibir a ligação entre o receptor de FGF2 e FGF. Se ou não o aptâmero usado na presente invenção inibe a ligação entre receptor de

FGF2 e FGF pode ser avaliado por, por exemplo, um teste usando o método de ressonância plasmônica de superfície tal como o Exemplo 1 e similares.

[017] Embora o aptâmero para FGF2 não seja particularmente limitado, por exemplo, o aptâmero descrito em WO 2015/147017, especificamente, um aptâmero contendo uma sequência de nucleotídeo representada pela fórmula (1) seguinte (em que uracila é opcionalmente timina):



e é o (a) ou (b) seguinte:

(a) um aptâmero em que, nos nucleotídeos contidos no aptâmero,

(i) a posição 2' da ribose de cada nucleotídeo de pirimidina é um átomo de flúor,

(ii) a posição 2' da ribose de cada nucleotídeo de purina é um grupo hidróxi;

(b) o aptâmero de (a), em que

(i) o átomo de flúor na posição 2' da ribose de cada nucleotídeo de pirimidina é independentemente não substituído, ou substituído por um átomo ou grupo selecionado a partir do grupo consistindo em um átomo de hidrogênio, um grupo hidróxi e um grupo metóxi,

(ii) o grupo hidróxi na posição 2' da ribose de cada nucleotídeo de purina é independentemente não substituído, ou substituído por um átomo ou grupo selecionado a partir do grupo consistindo em um átomo de hidrogênio, um grupo metóxi e um átomo de flúor.

[018] Na fórmula (1) mencionada acima, N^1 e N^6 são todos independentemente quaisquer 0 a várias bases e N^2 , N^3 , N^4 e N^5 são independentemente qualquer uma base. No presente relatório

descritivo, "base" significa qualquer uma de adenina (A), guanina (G), citosina (C), uracila (U) ou timina (T) que constitui um ácido nucleico.

[019] Embora o número de base de N^1 não seja particularmente limitado contanto que um aptâmero contendo uma sequência de nucleotídeo representada pela fórmula (1) se ligue a FGF2, o mesmo pode ser, por exemplo, 0 a cerca de 10, 0 a 9, 0 a 8, 0 a 7, 0 a 6, 0 a 5, 0 a 4, 0 a 3, 0 a 2 e similares, preferivelmente 0 a 2.

[020] Similarmente, embora o número de base de N^6 não seja particularmente limitado, o mesmo pode ser, por exemplo, 0 a cerca de 10, 0 a 9, 0 a 8, 0 a 7, 0 a 6, 0 a 5, 0 a 4, 0 a 3 e similares, preferivelmente 0 a 10, 3 a 9, ou 5 a 8.

[021] Em uma modalidade preferida, na fórmula (1) mencionada acima,

N^1 é G, GG, AG, C ou intervalo,

N^2 é A ou U,

N^3 é G, C ou A,

N^4 é G, C ou U,

N^5 é G ou U, e

N^6 é $UUCN^{61}$ ou $AGUCN^{62}$ em que N^{61} e N^{62} são todos independentemente quaisquer 0 a várias bases. Aqui, N^1 é um "intervalo" e significa que N^1 é ausente na fórmula (1), isto é, N^1 é 0 base.

[022] Embora o número de base de N^{61} não seja particularmente limitado, o mesmo pode ser, por exemplo, 0 a cerca de 10, 0 a 7, 0 a 6, 0 a 5, 0 a 4 e similares, preferivelmente 0 a 5, 1 a 5, ou 2 a 4.

[023] Embora o número de base de N^{62} também não seja particularmente limitado, o mesmo pode ser, por exemplo, 0 a cerca de 10, 0 a 7, 0 a 5, 0 a 4, 0 a 3 e similares, preferivelmente 0 a 5, 0 a 4, ou 0 a 3.

[024] Em uma outra modalidade preferida, na fórmula (1) mencionada acima,

N¹ é G, GG, AG ou intervalo,

N² é A ou U,

N³ é G ou A,

N⁴ é C ou U,

N⁵ é G ou U,

N⁶ é UUCN⁶¹ ou AGUCN⁶² em que N⁶¹ e N⁶² são como definidos acima.

[025] Em uma modalidade preferida, o aptâmero usado na presente invenção contém uma sequência de nucleotídeo representada pela fórmula (2) ou (3) seguinte:

GGGAAACUAGGGCGUUAACGUGACCAGUGUUUCN⁶¹ (2)

N¹GGAUACUAGGGCAUUAUGUUACCAGUGUAGUCN⁶² (3)

em que N¹, N⁶¹ e N⁶² são como definidos acima, mais preferivelmente, uma sequência de nucleotídeo representada pela fórmula (3).

[026] Em uma modalidade preferida, o aptâmero usado na presente invenção contém uma sequência de nucleotídeo mostrada por qualquer uma das SEQ ID N^{os}: 1 a 12. As sequências de nucleotídeo mostradas nas SEQ ID N^{os}: 1 a 12 são fornecidas abaixo (em que uracila é opcionalmente timina) (em seguida A, G, C e U mostram que a base de nucleotídeo é adenina, guanina, citosina ou uracila, respectivamente):

SEQ ID N^o: 1:

GGGAUACUAGGGCAUUAUGUUACCAGUGUAGUCUCGA

SEQ ID N^o: 2:

GGGAAACUAGGGCGUUAACGUGACCAGUGUUUCUCGA

SEQ ID N^o: 3:

GGGAUACUAGGGCAUUAUGUUACCAGUGUAGUCCC

SEQ ID N^o: 4:

GGAUACUAGGGCAUUAUGUUACCAGUGUAGUCC

SEQ ID N°: 5:

GGGGAUACUAGGGCAUUAUGUUACCAGUGUAGUCCCC

SEQ ID N°: 6:

AGGGAUACUAGGGCAUUAUGUUACCAGUGUAGUCCC

SEQ ID N°: 7:

GGGAAACUAGGGCGUUAACGUGACCAGUGUUUCCC

SEQ ID N°: 8:

CGGAUACUAGGGCAUUAUGUUACCAGUGUAGUCCG

SEQ ID N°: 9:

CCGAUACUAGGGCAUUAUGUUACCAGUGUAGUCGG

SEQ ID N°: 10:

GGGAUACUAGGGCGUUAACGUUACCAGUGUAGUCCC

SEQ ID N°: 11:

GGGAUACUAGGGCCUUAAGGUUACCAGUGUAGUCCC

SEQ ID N°: 12:

GGGAUACUAGGGCAUUUAUGUUACCAGUGUAGUCCC

[027] Em uma modalidade preferida, o aptâmero usado na presente invenção contém uma sequência de nucleotídeo mostrada na SEQ ID N°: 1, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10 ou 12, mais preferivelmente, SEQ ID N°: 3, 8, 9, 10 ou 12.

[028] Em uma outra modalidade preferida, o aptâmero usado na presente invenção contém uma sequência de nucleotídeo mostrada na SEQ ID N°: 2 ou 7 (abrangida na fórmula (2) mencionada acima).

[029] Ainda em uma outra modalidade preferida, o aptâmero usado na presente invenção contém uma sequência de nucleotídeo mostrada na SEQ ID N°: 1, 3, 4, 5, 6 ou 8 (abrangida na fórmula (3) mencionada acima).

[030] Em uma modalidade, o aptâmero usado na presente invenção pode conter, em qualquer uma das sequências de nucleotídeo mencionadas acima, uma sequência de nucleotídeo em que 1 ou vários

nucleotídeos são substituídos, deletados, inseridos ou adicionados, contanto que o aptâmero ainda se ligue a FGF2 e pode ser

(a) um aptâmero em que, nos nucleotídeos contidos no aptâmero,

(i) a posição 2' da ribose de cada nucleotídeo de pirimidina é um átomo de flúor,

(ii) a posição 2' da ribose de cada nucleotídeo de purina é um grupo hidróxi,;

(b) o aptâmero de (a), em que

(i) o átomo de flúor na posição 2' da ribose de cada nucleotídeo de pirimidina é independentemente não substituído, ou substituído por um átomo ou grupo selecionado a partir do grupo consistindo em um átomo de hidrogênio, um grupo hidróxi e um grupo metóxi,

(ii) o grupo hidróxi na posição 2' da ribose de cada nucleotídeo de purina é independentemente não substituído, ou substituído por um átomo ou grupo selecionado a partir do grupo consistindo em um átomo de hidrogênio, um grupo metóxi e um átomo de flúor.

[031] Como usado aqui, o número dos nucleotídeos mencionados acima substituídos, deletados, inseridos ou adicionados não é particularmente limitado contanto que o aptâmero ainda se ligue a FGF2 mesmo depois da substituição, deleção, inserção ou adição. O mesmo pode ser, por exemplo, 1 a cerca de 10, preferivelmente 1 a 6, mais preferivelmente 1 a 5, ainda preferivelmente 1 a 4, ainda preferivelmente 1 a 3, o mais preferivelmente 1 ou 2. Embora o sítio do nucleotídeo a ser substituído, deletado, inserido ou adicionado não seja particularmente limitado contanto que o aptâmero ainda se ligue a FGF2 mesmo depois da substituição, deleção, inserção ou adição, nos sítios especificados como sendo um tipo de nucleotídeo na fórmula (1) , (2) e

(3) mencionada acima (isto é, A, G, C ou U), nucleotídeos são substituídos, deletados, inseridos ou adicionados em 1 a 3, preferivelmente 1 ou 2, mais preferivelmente 1, sítio. Por outro lado, quando múltiplos tipos de nucleotídeos podem estar presentes nas fórmulas (1), (2) e (3) (isto é, N¹, N², N³, N⁴, N⁵, N⁶, N⁶¹ ou N⁶²), mais número de nucleotídeos (por exemplo, 1 a cerca de 10, preferivelmente 1 a 6, mais preferivelmente 1 a 5, ainda preferivelmente 1 a 4) pode ser substituído, deletado, inserido ou adicionado. Por exemplo, quando a sequência de nucleotídeo mostrada na SEQ ID N^o: 3 é a sequência original, a SEQ ID N^o: 1 é a SEQ ID N^o: 3 em que o CC 3'-terminal é substituído com UCGA, a SEQ ID N^o: 4 é a SEQ ID N^o: 3 em que um nucleotídeo é deletado de cada um dos ambos terminais, a SEQ ID N^o: 5 é a SEQ ID N^o: 3 em que G é adicionado ao 5'-terminal e C é adicionado ao 3'-terminal, a SEQ ID N^o: 6 é a SEQ ID N^o: 3 em que A é adicionado ao 5'-terminal, a SEQ ID N^o: 8 é a SEQ ID N^o: 3 em que o G 5'-terminal é substituído com C e o C 3'-terminal é substituído com G, a SEQ ID N^o: 9 é a SEQ ID N^o: 3 em que o GG 5'-terminal é substituído com CC e o CC 3'-terminal é substituído com GG, a SEQ ID N^o: 10 é a SEQ ID N^o: 3 em que o 14^o A é substituído com G e o 19^o U é substituído com C e a SEQ ID N^o: 12 é a SEQ ID N^o: 3 em que o 17^o A é substituído com U.

[032] O comprimento do aptâmero usado na presente invenção não é particularmente limitado e pode ser usualmente cerca de 10 a cerca de 200 nucleotídeos e pode ser, por exemplo, não menos do que cerca de 20 nucleotídeos (por exemplo, não menos do que 25 nucleotídeos, não menos do que 30 nucleotídeos, não menos do que 31 nucleotídeos, não menos do que 32 nucleotídeos, não menos do que 33 nucleotídeos), preferivelmente não menos do que 25 nucleotídeos, mais preferivelmente não menos do que 30 nucleotídeos, ainda preferivelmente não menos do que 33 nucleotídeos. Além disso, o

mesmo pode ser, por exemplo, não mais do que cerca de 100 nucleotídeos, geralmente não mais do que cerca de 80 nucleotídeos, preferivelmente não mais do que cerca de 70 nucleotídeos, mais preferivelmente não mais do que cerca de 60 nucleotídeos, ainda preferivelmente não mais do que cerca de 50 nucleotídeos, ainda preferivelmente não mais do que cerca de 45 nucleotídeos (por exemplo, não mais do que 44 nucleotídeos, não mais do que 43 nucleotídeos, não mais do que 42 nucleotídeos, não mais do que 41 nucleotídeos, não mais do que 40 nucleotídeos). Quando o número total de nucleotídeos é menor, a síntese química e a produção de massa serão mais fáceis e existe uma maior vantagem em termos de custo. Também é considerado que a modificação química é fácil, a estabilidade no corpo é alta e a toxicidade é baixa.

[033] Portanto, o comprimento do aptâmero usado na presente invenção pode ser geralmente cerca de 10 a cerca de 200 nucleotídeos, preferivelmente 20 a 80 nucleotídeos, mais preferivelmente 25 a 60 nucleotídeos, ainda preferivelmente 25 a 50 nucleotídeos, o mais preferivelmente 30 a 45 nucleotídeos.

[034] O aptâmero usado na presente invenção pode ser um conjugado selecionado a partir do grupo consistindo em um conjugado de múltiplos aptâmeros contendo uma sequência de nucleotídeo representada pela fórmula (1) mencionada acima (aptâmero (A)), um conjugado de múltiplos aptâmeros contendo uma sequência de nucleotídeo em que 1 ou vários nucleotídeos são substituídos, deletados, inseridos ou adicionados na sequência de nucleotídeo representada pela fórmula (1) mencionada acima (aptâmero (B)) e um conjugado de 1 ou múltiplos aptâmeros (A) e 1 ou múltiplos aptâmeros (B). Estes conjugados também podem se ligar a FGF2.

[035] Aqui, a conjugação pode ser obtida por ligação em tandem. Na conjugação, um ligante pode ser utilizado. Como o ligante, cadeias

de nucleotídeo (por exemplo, 1 a cerca de 20 nucleotídeos) e cadeias que não de nucleotídeo (por exemplo, ligante de $-(\text{CH}_2)_n-$, ligante de $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-$, ligante de hexaetileno glicol, ligante de TEG, ligante contendo peptídeo, ligante contendo ligação $-\text{S}-\text{S}-$, ligante contendo ligação $-\text{CONH}-$, ligante contendo ligação $-\text{OPO}_3-$) podem ser mencionadas. A pluralidade como mencionado no conjugado descrito acima de uma pluralidade do mesmo não é particularmente limitada, contanto que ela seja duas ou mais e a pluralidade pode ser, por exemplo, 2, 3 ou 4.

[036] Cada nucleotídeo contido no aptâmero usado na presente invenção é o mesmo ou diferente e pode ser um nucleotídeo compreendendo um grupo hidroxila na posição 2' de ribose (por exemplo, ribose de nucleotídeo de pirimidina, ribose de nucleotídeo de purina) (isto é, um nucleotídeo natural) ou um nucleotídeo em que o grupo hidroxila é substituído (modificado) por qualquer átomo ou grupo na posição 2' de ribose (algumas vezes indicado como "nucleotídeo modificado" no presente relatório descritivo).

[037] Como exemplos de qualquer um de tal átomo ou grupo, um nucleotídeo substituído por um átomo de hidrogênio, um átomo de flúor ou um grupo $-\text{O}-\text{alquila}$ (por exemplo, grupo $-\text{O}-\text{Me}$), um grupo $-\text{O}-\text{acila}$ (por exemplo, grupo $-\text{O}-\text{CHO}$), ou um grupo amino (por exemplo, grupo $-\text{NH}_2$) pode ser mencionado. No aptâmero usado na presente invenção, pelo menos um tipo (por exemplo, 1, 2, 3 ou 4 tipos) de nucleotídeo também pode ser um nucleotídeo modificado compreendendo um grupo hidroxila, ou qualquer átomo ou grupo descrito acima, por exemplo, pelo menos dois tipos (por exemplo, 2, 3 ou 4 tipos) de grupos selecionados a partir do grupo consistindo em um átomo de hidrogênio, um átomo de flúor, um grupo hidroxila e um grupo $-\text{O}-\text{Me}$, na posição 2' de ribose.

[038] No aptâmero usado na presente invenção, todos os nucleotídeos de pirimidina podem ser nucleotídeos em que a posição 2'

de ribose é um átomo de flúor, ou pode ser a mesma ou diferente e nucleotídeos em que o átomo de flúor é não substituído, ou substituído por qualquer átomo ou grupo mencionado acima, preferivelmente um átomo ou grupo selecionado a partir do grupo consistindo em um átomo de hidrogênio, um grupo hidroxila e um grupo metóxi. Particularmente, quando um método de produção usando o Kit de Transcrição T7 DuraScribe™ (fabricado por Epicentre) é aplicado como um método de produção do aptâmero usado na presente invenção, um aptâmero em que a posição 2' de ribose de todos os nucleotídeos de pirimidina é fluorada pode ser obtido. O aptâmero em que o átomo de flúor é substituído por outro átomo ou grupo mencionado acima pode ser produzido pelo método mencionado abaixo.

[039] No aptâmero usado na presente invenção, todos os nucleotídeos de purina podem ser nucleotídeos em que a posição 2' de ribose é um grupo hidróxi, ou podem ser os mesmos ou diferentes e nucleotídeos em que o grupo hidróxi é não substituído, ou um nucleotídeo substituído por qualquer átomo ou grupo mencionado acima, preferivelmente um átomo ou grupo selecionado a partir do grupo consistindo em um átomo de hidrogênio, um grupo metóxi e um átomo de flúor na posição 2' de ribose. O aptâmero em que um grupo hidroxila é substituído por outro átomo ou grupo mencionado acima pode ser produzido pelo método mencionado abaixo.

[040] No aptâmero usado na presente invenção, todos os nucleotídeos de pirimidina podem ser nucleotídeos em que o átomo de flúor na posição 2' de ribose é substituído por qualquer um dos átomos ou grupos anteriormente mencionados, por exemplo, os mesmos átomos ou grupos selecionados a partir do grupo consistindo em um átomo de hidrogênio, um grupo hidróxi e um grupo -O-Me.

[041] No aptâmero usado na presente invenção, além disso, todos os nucleotídeos de purina podem ser nucleotídeos em que o grupo

hidróxi na posição 2' de ribose é substituído por qualquer um dos átomos ou grupos anteriormente mencionados, por exemplo, os mesmos átomos ou grupos selecionados a partir do grupo consistindo em um átomo de hidrogênio, um átomo de flúor e um grupo -O-Me.

[042] Em uma modalidade preferível, cada nucleotídeo de pirimidina contido no aptâmero usado na presente invenção é um nucleotídeo contendo um átomo de flúor na posição 2' de ribose e cada nucleotídeo de purina é um nucleotídeo tendo um grupo hidróxi na posição 2' de ribose. Em uma outra modalidade, o átomo de flúor mencionado acima na posição 2' da ribose de cada nucleotídeo de pirimidina é independentemente opcionalmente substituído por um átomo ou grupo selecionado a partir do grupo consistindo em um átomo de hidrogênio, um grupo hidróxi e um grupo metóxi e o grupo hidróxi mencionado acima na posição 2' da ribose de cada nucleotídeo de purina é opcionalmente independentemente substituído por um átomo ou grupo selecionado a partir do grupo consistindo em um átomo de hidrogênio, um grupo metóxi e um átomo de flúor.

[043] Nesta descrição, os nucleotídeos que constituem o aptâmero são considerados RNAs (isto é, os grupos açúcar são considerados ribose) em descrever como os grupos açúcar são modificados nos nucleotídeos. Entretanto, isto não significa que o DNA é isento dos nucleotídeos que constituem o aptâmero e uma modificação de RNA deve ser lida como uma modificação de DNA conforme apropriado. Quando o nucleotídeo que constitui o aptâmero é DNA, por exemplo, a substituição do grupo hidroxila na posição 2' de ribose por X deve ser lida como uma substituição de um átomo de hidrogênio na posição 2' de desoxirribose por X.

[044] Quando uracila é substituído com timina no aptâmero da presente invenção, a atividade de ligação a FGF2, a atividade inibitória de ligação ao receptor de FGF2-FGF, a estabilidade, a liberabilidade do

fármaco e a estabilidade no sangue do aptâmero e similares podem ser aumentadas.

[045] No aptâmero usado na presente invenção, 1 ou vários, por exemplo, 1 a 2, 1 a 3, 1 a 4, 1 a 5 nucleotídeos de ligação diéster de ácido fosfórico no nucleotídeo podem ser modificados ou substituídos por quaisquer substituintes. Por exemplo, a ligação diéster de ácido fosfórico pode ser substituída por uma ligação fosforotioato, uma ligação fosforoditioato, uma ligação alquilfosfonato, uma ligação fosforamidato e similares. Aqui, por exemplo, "nucleotídeo é substituído por uma ligação fosforotioato" significa que um grupo ácido fosfórico em um sítio de ligação entre nucleotídeos adjacentes é sulfurado, isto é, uma ligação fosfodiéster é alterada para uma ligação fosforotioato.

[046] No aptâmero usado na presente invenção, um ou vários, por exemplo, 1 a 2, 1 a 3, 1 a 4, 1 a 5 nucleotídeos podem ser substituídos por Ácido Nucleico Ligado em Ponte (BNA) ou Ácido Nucleico Bloqueado (LNA) para estabilizar o aptâmero e melhorar a atividade do mesmo. Como usado aqui, o "Ácido Nucleico Ligado em Ponte" se refere a um tendo uma estrutura em que a afinidade de ligação a uma sequência complementar é realçada restringindo-se o grau de liberdade do ácido nucleico por reticulação intramolecular e adquire resistência à nuclease. Exemplos do mesmo incluem, mas não são limitados a, 2',4'-BNA (Ácido Nucleico Bloqueado (LNA)), Ácido Nucleico Ligado em Ponte de 2'-O,4'-C-etileno (ENA) e similares.

[047] O aptâmero usado na presente invenção pode ser um em que um resíduo de açúcar (por exemplo, ribose) de cada nucleotídeo foi modificado para aumentar a atividade de ligação a FGF2, a estabilidade, a liberabilidade do fármaco e similares. Como exemplos da modificação em um resíduo de açúcar, a substituição do átomo de oxigênio na posição 2', posição 3' e/ou posição 4' do resíduo de açúcar com um outro átomo e similares pode ser mencionada. Como o tipo da

modificação, fluoração, O-alquilação (por exemplo, O-metilação, O-etilação), O-arilação, S-alquilação (por exemplo, S-metilação, S-etilação), S-arilação e aminação (por exemplo, -NH₂) podem ser mencionados. Além disso, exemplos dos mesmos incluem 4'-SRNA em que o oxigênio da posição 4' é substituído com enxofre, LNA (Ácido Nucleico Bloqueado) em que a posição 2' e a posição 4' são reticuladas por intermédio de metileno, ácido nucleico de 3'-N-fosforamidato em que o grupo hidroxila da posição 3' é substituído com um grupo amino e similares. O aptâmero usado na presente invenção é algumas vezes produzido com uma dada modificação do átomo de oxigênio na posição 2' de ribose de nucleotídeo de pirimidina, devido ao método de produção do mesmo. Quando um método de produção usando, por exemplo, o Kit de Transcrição T7 DuraScribe™ (fabricado por Epicentre) é aplicado como um método de produção do aptâmero usado na presente invenção, um aptâmero em que a posição 2' de ribose de preferivelmente todos os nucleotídeos de pirimidina é fluorada é produzido. Portanto, é possível produzir várias variações de aptâmeros tendo atividade realçada ainda que a sequência de base seja a mesma, aplicando-se tal alteração no resíduo de açúcar ao aptâmero obtido. A partir do acima, o aptâmero usado na presente invenção pode ser preferivelmente um aptâmero em que um resíduo de açúcar de pelo menos um nucleotídeo é modificado. Tais alterações no resíduo de açúcar podem ser realizadas por um método conhecido por si (vide, para exemplo, Sproat *et al.*, (1991) Nucl. Acid. Res. 19, 733 - 738; Cotton *et al.*, (1991) Nucl. Acid. Res. 19, 2629 - 2635; Hobbs *et al.*, (1973) Biochemistry 12, 5138 - 5145). Para ser específico, um aptâmero em que o grupo hidroxila na posição 2' de ribose é substituído por um átomo ou grupo selecionado a partir do grupo consistindo em um átomo de hidrogênio, um grupo hidroxila e um grupo metóxi pode ser produzido usando-se, como uma base, um aptâmero em que o grupo hidroxila na

posição 2' de ribose de todos os nucleotídeos de pirimidina é substituído por um grupo fluoro.

[048] O aptâmero usado na presente invenção também pode ter uma base de ácido nucleico (por exemplo, purina ou pirimidina) alterada (por exemplo, substituição química) para realçar a atividade de ligação a FGF2, prevenção da multimerização, estabilidade, liberabilidade do fármaco e similares. Como exemplos de tais alterações, a alteração de pirimidina na posição 5, alteração de purina na(s) posição(ões) 6 e/ou 8, alteração com uma amina extracíclica, substituição com 4-tiouridina e substituição com 5-bromo ou 5-iodo-uracila podem ser mencionadas. O grupo fosfato contido no aptâmero usado na presente invenção pode ser alterado para conferir resistência à nuclease e hidrólise. Por exemplo, o grupo P(O)O pode ser substituído com P(O)S (tioato), P(S)S (ditioato), P(O)N(R)R' (amidato), P(O)R, P(O)OU, CO ou CH₂ (formacetal) ou 3'-amina (-NH-CH₂-CH₂-) [em que cada unidade de R ou R' é independentemente H ou um alquila substituído ou não substituído (por exemplo, metila, etila)].

[049] O grupo de ligação é, por exemplo, -O-, -N- ou -S- e nucleotídeos podem se ligar a um nucleotídeo adjacente por intermédio destes grupos de ligação.

[050] As alterações também podem incluir alterações tais como *capping* em 3' e 5'.

[051] Uma alteração pode ser realizada ainda adicionando-se a uma extremidade um polietilenoglicol (PEG), aminoácido, peptídeo, dT invertido, ácido nucleico, nucleosídeos, Miristoíla, Litocólico-oleíla, Docosanila, Lauroíla, Estearoíla, Palmitoíla, Oleoíla, Linoleoíla, outros lipídeos, esteroides, colesterol, cafeína, vitaminas, corantes, substâncias fluorescentes, agentes anticâncer, toxinas, enzimas, substâncias radioativas, biotina e similares. Para tais alterações, vide, para exemplo, as Patentes dos EUA 5.660.985 e 5.756.703.

[052] Particularmente, quando a alteração é realizada por adição no término de PEG, o peso molecular de PEG não é particularmente limitado e é preferivelmente 1000 a 100000, mais preferivelmente 30000 a 90000. PEG pode ser linear ou ramificado em duas ou mais cadeias (PEG de ramificações múltiplas). A adição no término de PEG é útil para impedir a multimerização do aptâmero mencionado abaixo.

[053] Tal PEG não é particularmente limitado e aqueles técnicos no assunto podem selecionar e usar apropriadamente PEG comercialmente disponível ou conhecido (por exemplo, http://www.peg-drug.com/peg_product/branched.html). Exemplos preferíveis específicos do PEG a ser aplicado ao aptâmero usado na presente invenção incluem PEG tipo GS de duas ramificações tendo um peso molecular de 40000 (SUNBRIGHT GL2-400GS fabricado por NOF CORPORATION), PEG do tipo TS de 2 ramificações tendo um peso molecular de 40000 (SUNBRIGHT GL2-400TS fabricado por NOF CORPORATION), PEG do tipo TS de 4 ramificações tendo um peso molecular de 40000 (SUNBRIGHT GL4-400TS fabricado por NOF CORPORATION), PEG do tipo TS de 2 ramificações tendo um peso molecular de 80000 (SUNBRIGHT GL2-800TS fabricado por NOF CORPORATION), PEG do tipo TS de 4 ramificações tendo um peso molecular de 80000 (SUNBRIGHT GL4-800TS fabricado por NOF CORPORATION) e similares.

[054] Neste caso, no aptâmero usado na presente invenção, PEG pode ser diretamente adicionado ao término. É mais preferível que um ligante tendo um grupo ligável a PEG e similares seja adicionado ao término do mesmo e PEG seja adicionado ao aptâmero usado na presente invenção por intermédio do ligante.

[055] O ligante para PEG e o aptâmero usado na presente invenção não é particularmente limitado e o número da cadeia de carbono, grupo funcional e similares podem ser apropriadamente

selecionados de acordo com o sítio de ligação, o tipo de PEG e similares. Exemplos de tal ligante incluem um ligante tendo um grupo amino. Especificamente, quando adicionado à extremidade 5', Ligante de ssH (SAFC) ou DMS(O)MT-AMINO-MODIFIER (GLEN RESEARCH) pode ser mencionado e quando adicionado à extremidade 3', TFA Amino C-6 Icaa CPG (ChemGenes) e similares pode ser mencionado. Quando este ligante é selecionado, por exemplo, um grupo ativo de N-hidroxissuccinimida é adicionado a PEG e reagido com um grupo amino no lado do ligante, por meio do qual o aptâmero usado na presente invenção pode ser ligado a PEG por intermédio do ligante.

[056] Como PEG e ligante, produtos comercialmente disponíveis podem ser preferivelmente usados. As condições de reação e similares se referindo à ligação de PEG, um ligante e o aptâmero usado na presente invenção podem ser apropriadamente determinados por aqueles técnicos no assunto.

[057] As modalidades mais preferidas do aptâmero usado na presente invenção incluem aptâmero ID1 contendo a sequência de nucleotídeo mostrada na SEQ ID N^o: 3:

GL2-400TS-C6-

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

aptâmero ID2 contendo a sequência de nucleotídeo mostrada na SEQ ID N^o: 8:

GL2-400TS-C6-

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

aptâmero ID3 contendo a sequência de nucleotídeo mostrada na SEQ ID N^o: 9:

GL2-400TS-C6-

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

aptâmero ID4 contendo a sequência de nucleotídeo mostrada na SEQ ID N^o: 10:

GL2-400TS-C6-

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

aptâmero ID5 contendo a sequência de nucleotídeo mostrada na SEQ ID N^o: 12:

GL2-400TS-C6-

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

aptâmero ID6 contendo a sequência de nucleotídeo mostrada na SEQ ID N^o: 3:

idT-

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

[058] Em cada uma das fórmulas mencionadas acima, os parênteses em cada nucleotídeo indicam a modificação da posição 2' de ribose, F é um átomo de flúor e M é um grupo metóxi.

[059] Independente de qual destes aptâmeros é usado, estes aptâmeros podem estar estavelmente presentes na constituição da preparação de aptâmero da presente invenção e assim são adequados como o ingrediente ativo da preparação de aptâmero da presente invenção.

[060] O aptâmero usado na presente invenção pode ser uma forma livre ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo. Exemplos

de tal sal incluem sal metálico, sal de amônio, sal de adição de amina orgânica, sal de adição de aminoácido e similares. Exemplos do sal metálico incluem sais de metal alcalino tais como sal de sódio, sal de potássio e similares, sais de metal alcalino terroso tais como sal de magnésio, sal de cálcio e similares, sal de alumínio, sal de zinco e similares. Exemplos do sal de amônio incluem sais tais como amônio, tetrametilamônio e similares. Exemplos do sal de adição de amina orgânica incluem sais tais como tris-hidroxiaminometano e similares. Exemplos do sal de adição de aminoácido incluem sais de lisina, arginina, histidina, triptofano, ornitina e similares.

[061] A concentração do aptâmero para FGF2 usado na presente invenção não é particularmente limitada e o aptâmero pode ser contido em qualquer quantidade contanto que a preparação do aptâmero da presente invenção exerça a eficácia e efeito desejados. No presente relatório descritivo, a "concentração do aptâmero" significa a proporção (mg/mL) do peso da parte ácido nucleico ligada pela ligação fosfato 5'→3' que constitui a molécula de aptâmero ao volume da preparação integral. A concentração do aptâmero é, por exemplo, 1 a 60 mg/mL.

[062] Quando a concentração do aptâmero para FGF2 excede 20 mg/mL, um multímero do aptâmero tende a ser facilmente produzido mesmo na temperatura de armazenamento geral de 4 a 5°C. O aptâmero para FGF2 quando presente como um monômero se liga a FGF2 e inibe a função de FGF2 e exerce a eficácia do mesmo. Entretanto, quando ele é multimerizado, a ligação a FGF2 não é observada em um ensaio usando viacore. Assim, é considerado que o aptâmero não inibe a função de FGF2 (vide Exemplo 4). Quando a concentração do aptâmero é baixa, a distância intermolecular é longa e a tendência a multimerizar é baixa. Entretanto, quando a concentração do aptâmero excede 20 mg/mL, o aptâmero é multimerizado mesmo na temperatura de armazenamento geral de 4 a 5°C, como um resultado

do qual a atividade de ligação a FGF2 tende a diminuir como um todo (vide Exemplo 5). Portanto, o limite superior da concentração do aptâmero de FGF2 na preparação de aptâmero da presente invenção é desejavelmente uma concentração não excedendo 20 mg/mL. Além disso, quando a concentração do aptâmero na preparação de aptâmero da presente invenção é baixa, o efeito como uma injeção pode não ser obtido. Portanto, embora o limite inferior da concentração do aptâmero na preparação de aptâmero da presente invenção não seja particularmente limitado contanto que o efeito como uma injeção possa ser obtido, o mesmo é desejavelmente, por exemplo, uma concentração de não menos do que 1 mg/mL.

[063] A forma de dosagem da preparação de aptâmero da presente invenção não é particularmente limitada contanto que ela seja um líquido aquoso. A mesma é preferivelmente uma injeção. Visto que a preparação de aptâmero da presente invenção é um líquido aquoso, o aptâmero para FGF2, que é o ingrediente ativo, é dissolvido em um solvente.

[064] É bem conhecido que aptâmeros geralmente requerem um sal inorgânico, que é um eletrólito forte, para manter a estrutura de ordem mais alta dos mesmos. Macugen (marca registrada), que é o único produto farmacêutico de aptâmero correntemente no mercado, também contém hidrogeno fosfato de sódio, diidrogeno fosfato de sódio, um agente de isotonicidade e um ajustador de pH. Macugen neste estado mostrou ser estável por 6 meses em um teste acelerado a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ e por 36 meses em um teste de armazenamento a longo prazo a $5\pm 3^{\circ}\text{C}$. A partir disto, aqueles técnicos no assunto devem considerar que um sal inorgânico (eletrólito) é necessário para a existência estável do aptâmero em uma injeção enquanto mantendo a estrutura de ordem mais alta do aptâmero.

[065] Entretanto, como mostrado no Exemplo mencionado abaixo,

foi constatado que quando PBS ou solução salina fisiológica é usada como o solvente, o aptâmero para FGF2 mencionado acima, que é o ingrediente ativo na presente invenção, tende a perder estabilidade e a formar um multímero devido à influência do sal inorgânico que é um eletrólito forte e, como um resultado, perde a atividade de ligação a FGF2. Portanto, os presentes inventores usaram água livre de um sal inorgânico (eletrólito) como um solvente e inesperadamente constataram que a multimerização do aptâmero de FGF2 foi suprimida e a proporção de aptâmero de FGF2 presente como um monômero aumentou (vide o Exemplo 3).

[066] Sem desejar estar ligado pela teoria, quando um aptâmero de FGF2 é dissolvido em água, o valor de T_m do aptâmero de FGF2 não pode ser medido como mostrado no exemplo 1 e a mudança de próton em RMN não pode ser observada como mostrado no exemplo 2. Assim, o aptâmero de FGF2 dissolvido em água é considerado existir como um monômero em um estado de ser completamente estendido. Isto é, é considerado que a estrutura de ordem mais alta do aptâmero, que é considerada necessária para a construção de atividade, é destruída usando-se água livre de sal inorgânico como um solvente, desnaturado e existe em um estado de filamento único, por meio do qual a desativação (multimerização) pode ser impedida. Além disso, como mostrado nos exemplos 4 e 5, quando o ensaio de ressonância plasmônica de superfície (SPR) foi realizado dissolvendo-se em uma solução contendo um eletrólito, o aptâmero de FGF2 manteve a atividade de ligação a FGF2. Assim, foi demonstrado que quando o aptâmero de FGF2 dissolvido em água é administrado no corpo, a estrutura de ordem mais alta necessária para a atividade do aptâmero é reconstruída pela ação do eletrólito presente no corpo fluido e a atividade pode ser exibida.

[067] Como descrito acima, foi revelado que uma formulação de

preparação em que a estrutura de ordem mais alta do aptâmero de FGF2 é intencionalmente destruída para causar um estado completamente alongado dissolvendo-se o aptâmero em um solvente livre de um eletrólito, desse modo também impedindo a multimerização durante o armazenamento a longo prazo e, depois da administração, a estrutura de ordem mais alta é reconstruída por exposição a uma concentração salina fisiológica e a eficácia exercida pode eventualmente manter a atividade do aptâmero de FGF2 por um longo prazo. A presente invenção foi concluída verificando-se em detalhe o modo de existência de aptâmero em tal solução e não pode ser facilmente considerado mesmo por pessoas versadas na técnica.

[068] A partir do acima, o solvente usado para a preparação de aptâmero da presente invenção é preferivelmente um solvente aquoso livre de um sal inorgânico (eletrólito) e água é particularmente preferível.

[069] Como descrito acima, visto que um solvente livre de um sal inorgânico (eletrólito) é usado para a preparação de aptâmero da presente invenção, a pressão osmótica é baixa e a preparação não pode ser usada como uma injeção como ela está. Portanto, a preparação de aptâmero da presente invenção é caracterizada em que ela contém um osmorregulador que não de eletrólito (osmólito) para o propósito de ajustar a razão de pressão osmótica para a pressão osmótica do plasma para 1 ou mais, preferivelmente 1 a 3.

[070] O osmorregulador usado para a preparação de aptâmero da presente invenção não é particularmente limitado contanto que ele seja um não eletrólito e possa ser qualquer osmorregulador geralmente usado exceto íons inorgânicos (íon potássio, íon cloreto, etc.). Exemplos do osmorregulador incluem álcoois poliidrícos (glicerol, manitol, trealose, glicose, sacarose, sorbitol, inositol, etc.), aminoácidos (alanina, glicina, glutamato, prolina, GABA, taurina, ectina, etc.), metilamônios (TMAO, colina, acetilcolina, glicina betaína, GPC, DMSP, etc.), ureias e

similares. Álcoois poliidrícos são preferivelmente usados e manitol é mais preferivelmente usado.

[071] A quantidade do osmorregulador não é particularmente limitada e aqueles técnicos no assunto podem mudar apropriadamente a quantidade de aptâmero de FGF2 na preparação de acordo com o tipo (peso molecular) do osmorregulador a ser usado e a pressão osmótica alvo. Por exemplo, quando manitol é usado como o osmorregulador e a razão da pressão osmótica para a solução salina fisiológica é cerca de 1, a razão de combinação do osmorregulador na injeção inteira é 2 a 7,5% (p/v). Mais especificamente, quando a razão da pressão osmótica para a solução salina fisiológica é 1, a razão de combinação de manitol é 4,9% quando a concentração do aptâmero de FGF2 mencionado acima é 2 mg/ml e a razão de combinação de manitol é 3,6% quando a concentração do aptâmero de FGF2 mencionado acima é 20 mg/ml.

[072] A preparação de aptâmero da presente invenção é preferivelmente substancialmente livre de um eletrólito exceto o aptâmero para FGF2 ou um sal do mesmo para ser o ingrediente ativo. Como usado aqui, "substancialmente livre" significa que uma pequena quantidade de eletrólito pode estar contida contanto que o aptâmero de FGF2 na preparação possa ser estavelmente armazenado por um longo prazo. Mais preferivelmente, a preparação de aptâmero da presente invenção não contém um eletrólito exceto o aptâmero para FGF2 ou um sal do mesmo para ser o ingrediente ativo.

[073] A preparação de aptâmero da presente invenção pode conter ainda um aditivo farmacologicamente aceitável onde necessário. Exemplos de tal aditivo incluem estabilizador, preservante, solubilizador, tampão, ajustador de pH, agente suavizante e similares e aditivos farmacêuticos de não eletrólito bem conhecidos que são convencionalmente usados como aditivos para injeções podem ser preferivelmente usados.

[074] O pH da preparação de aptâmero da presente invenção não é particularmente limitado. Quando a preparação é usada como uma injeção, o pH é desejavelmente quase neutro e pode ser apropriadamente selecionado dentro da faixa de, por exemplo, 5 a 9, preferivelmente 6 a 8. Quando um aptâmero para FGF2 ou um sal do mesmo, que é o ingrediente ativo, é dissolvido em água, o pH da solução cai dentro da faixa mencionada acima. Portanto, não é necessário adicionar um ajustador de pH de eletrólito ou tampão à preparação de aptâmero da presente invenção.

[075] A preparação de aptâmero da presente invenção pode conter outros ingredientes ativos contanto que eles não afetem adversamente a atividade e a estabilidade do aptâmero de FGF2. Como tal ingrediente ativo, inibidores de VEGF tais como McGen (marca registrada), Lucentis (marca registrada), Eylea (marca registrada), Avastin (marca registrada) e similares como fármacos terapêuticos para doenças acompanhadas por angiogênese e similares, agentes anti-inflamatórios tais como esteroides e similares, preparações de hormônio de crescimento humano tais como Norditropin (marca registrada) e Genotropin (marca registrada) como agentes terapêuticos para doenças ósseas e similares e agentes analgésicos/sedativos tal como morfina podem estar contidos. Exemplos dos mesmos incluem compostos farmacêuticos para tratar ou prevenir doenças acompanhadas por angiogênese tais como degeneração macular relacionada à idade e similares, doenças dos ossos ou cartilagens tais como osteoporose, artrite reumatoide, osteoartrite, fratura óssea e similares e dor.

[076] A preparação de aptâmero da presente invenção tendo o constituinte mencionado acima é estável a 4°C por não menos do que 3 meses. Como usado aqui, "estável" significa que a proporção de um aptâmero monomérico na preparação depois do armazenamento da preparação incluída em um frasco de vidro a 4°C é não menos do que

70%, como mencionado acima. Preferivelmente, na preparação de aptâmero da presente invenção, a proporção de um aptâmero monomérico na preparação depois do armazenamento a 4°C por 3 meses é não menos do que 80%. Além disso, a preparação de aptâmero da presente invenção é estável mesmo quando exposta à iluminação fluorescente branca ou iluminação fluorescente próxima de ultravioleta.

[077] Portanto, a preparação de aptâmero da presente invenção pode ser armazenada estavelmente por um longo prazo na forma de um líquido aquoso como está, preferivelmente em uma forma de dosagem de uma injeção tal como uma seringa pré-cheia, cartucho ou similares, refrigerando-se em não mais do que 5°C e é extremamente fácil de manejar.

[078] A preparação de aptâmero da presente invenção pode ser preferivelmente usada como, por exemplo, um medicamento para o tratamento ou prevenção de doenças acompanhadas por angiogênese tais como degeneração macular relacionada à idade e similares, doenças dos ossos ou cartilagens tais como osteoporose, artrite reumatoide, osteoartrite, fratura óssea e similares.

[079] A preparação de aptâmero da presente invenção pode ser administrada parenteralmente (por exemplo, administração intravenosa, administração subcutânea, administração intramuscular, administração tópica, administração intraperitoneal, administração intranasal, administração pulmonar, administração por instilação e similares). A dosagem da preparação de aptâmero da presente invenção varia dependendo do tipo e atividade de aptâmero de FGF2, gravidade da doença, espécie animal que é o indivíduo da administração, tolerabilidade medicamentosa do indivíduo de administração, peso corpóreo, idade e similares e a dosagem usual, com base na quantidade de ingrediente ativo (sítio de oligonucleotídeo de aptâmero) por dia para um adulto, pode ser cerca de 0,0001 a cerca de 100 mg/kg, por

exemplo, cerca de 0,0001 a cerca de 10 mg/kg, preferivelmente cerca de 0,005 a cerca de 1 mg/kg.

Exemplo

[080] A presente invenção é explicada em mais detalhe no seguinte se referindo aos Exemplos; entretanto, a presente invenção não é limitada pelos Exemplos.

Exemplo 1 (Análise estrutural do aptâmero de FGF2 em solvente: determinação do valor de T_m)

[081] A estrutura do aptâmero mostrado no aptâmero ID1 é mostrada abaixo. Letras maiúsculas mostram o RNA, letras minúsculas mostram o DNA e idT mostra dT invertido. Os parênteses em cada nucleotídeo mostram a modificação na posição 2' do mesmo, F mostra um átomo de flúor e M mostra um grupo O-metila. C6 mostra o ligante de -(CH₂)₆. PEG40TS2 é polietilenoglicol do tipo TS de 2 ramificações tendo um peso molecular de 40000 (SUNBRIGHT GL2-400TS fabricado por NOF CORPORATION).

aptâmero ID1:

GL2-400TS-C6-

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

[082] O aptâmero representado pelo aptâmero ID1 foi dissolvido em água a uma concentração de 0,1 mg/mL e em PBS ou solução salina fisiológica a uma concentração de 0,06 mg/mL. A solução obtida foi aquecida a 95°C por 5 min, resfriada até a temperatura ambiente e cheia em uma cubeta de vidro de quartzo. O valor de T_m foi determinado medindo-se a absorção UV com um espectrofotômetro enquanto mudando-se a temperatura de 20°C para 90°C.

[083] Como um resultado, o valor de T_m foi 60,1°C em PBS e 69,6 °C em solução salina fisiológica. Por outro lado, qualquer valor de T_m particular não foi observado em água. A partir disto, foi considerado

que o aptâmero representado pelo aptâmero ID1 forma uma estrutura de ordem mais alta por interação intermolecular em PBS ou solução salina fisiológica, que pode ser geralmente um solvente para injeções. Além disso, foi considerado que o aptâmero representado pelo aptâmero ID1 não forma um par de base entre as moléculas ou dentro da molécula e não forma uma estrutura de ordem mais alta em água livre de eletrólito.

Exemplo 2 (Análise estrutural de aptâmero de FGF2 em óxido de deutério: medição do espectro de RMN)

[084] Um aptâmero de 20 mg representado pelo aptâmero ID1 foi cheio em um frasco de vidro e dissolvido em cerca de 1 mL de óxido de deutério para preparar uma amostra de medição. Ele foi medido usando um espectrômetro de RMN 600 MHz Bruker Avance. Como um resultado, um sinal de iminopróton derivado da formação de pares de base, que deve ser observado em um campo magnético mais baixo do que 8 ppm, não foi observado.

[085] A partir disso, foi considerado que o aptâmero representado pelo aptâmero ID1 não forma um par de base entre as moléculas ou dentro da molécula e não forma uma estrutura de ordem mais alta em água livre de eletrólito.

Exemplo 3 (Análise estrutural do aptâmero de FGF2 em solução contendo eletrólito: medição de SEC-MALS)

[086] O aptâmero representado pelo aptâmero ID1 foi dissolvido em solução salina fisiológica a uma concentração de 20 mg/mL e incubado a 37 °C por 2 semanas para preparar artificialmente uma preparação de aptâmero de FGF2 que forma uma estrutura de ordem mais alta. A preparação e uma amostra obtida por congelamento e armazenamento imediatamente depois da preparação para minimizar a formação da estrutura de ordem mais alta foi cada uma diluída com solução salina fisiológica a 0,2 mg/mL e submetida à análise.

[087] Monômeros e multímeros foram separados por cromatografia de exclusão por tamanho e os respectivos pesos moleculares foram medidos com detector de MALS (Dispersão de Luz de Ângulos Múltiplos) fabricado por Wyatt Technology. A cromatografia de exclusão por tamanho foi realizada por ACQUITY UPLC fabricado por Waters e usando uma coluna BEH200 SEC.

[088] Como um resultado, o peso molecular do pico que pareceu ser um monômero foi medido para ser cerca de 64000 e o peso molecular do pico que pareceu ser uma estrutura de ordem mais alta composta de multímeros foi medido para ser cerca de 122000. A partir dos resultados, foi constatado que a estrutura de ordem mais alta formada pelo aptâmero representado pelo aptâmero ID1 em água contendo um eletrólito é um dímero.

Exemplo 4 (Correlação entre porcentagem de teor de monômero e atividade de ligação de aptâmero)

[089] O aptâmero representado pelo aptâmero ID1 foi dissolvido em PBS, solução salina fisiológica ou solução aquosa de manitol a 3,3% a uma concentração de 20 mg/mL ou 2 mg/mL para preparar preparações de aptâmero de FGF2 que mostram várias porcentagens de teor de monômero sob as condições de armazenamento mostradas na Tabela 1. O teor de monômero de cada uma das preparações de aptâmero de FGF2 preparadas foi determinado por cromatografia de exclusão por tamanho. Os resultados do mesmo também são mostrados na Tabela 1.

[090] A atividade de ligação de cada uma das preparações de aptâmero de FGF2 preparadas para a proteína de FGF2 foi medida por ressonância plasmônica de superfície (SPR) usando Biacore T200 fabricado por GE. Como o chip de sensor, CM4 que reage com um grupo amino foi usado. FGF2 humano foi dissolvido em solução de imobilização (10 mM de acetato de sódio, pH 6) em 10 µg/ml. Para a

reação de um grupo amino no lado da proteína e um grupo carboxila no lado do chip, cloridrato de etil-3-carbodiimida e N-hidroxissuccinimida foram usados. Depois da reação, o bloqueio por etanolamina foi realizado. A quantidade imobilizada de FGF2 foi ajustada para 1000 RU. Um aptâmero para analito foi preparado a 5 μ M. Como um tampão de corrida, 295 mM de cloreto de sódio, 5,4 mM de cloreto de potássio, 0,8 mM de cloreto de magnésio, 1,8 mM de cloreto de cálcio, 20 mM de Tris, 0,05% de Tween20, pH 7,6) foram usados e cloreto de sódio 2M foi usado como uma solução de regeneração. FGF2 foi imobilizado em uma célula de fluxo FC2 ou FC4 e os resultados de FC1 ou FC3 foram subtraídos para fornecer um sensorgrama final. A atividade foi avaliada como um valor relativo para a preparação de aptâmero de FGF2 padrão tendo um teor de multímero extremamente baixo e preparada quando em uso usando uma solução livre de um eletrólito.

[091] A Tabela 1 mostra o método de preparação, a porcentagem de teor de monômero e os resultados de medição da atividade de ligação à proteína de FGF2 das respectivas preparações de aptâmero de FGF2. A partir dos resultados, foi esclarecido que o teor de monômero da preparação de aptâmero de FGF2 e a atividade de ligação à proteína de FGF2 estão correlacionados.

Tabela 1

Porcentagem de teor de monômero e atividade de ligação à preparação de aptâmero FGF2 de proteína de FGF2

preparação de aptâmero de FGF2	método de preparação (condições de armazenamento)	porcentagem de teor de monômero (%)	atividade de ligação (%)
2 mg/mL de preparação de manitol a 3,3%	preparação sob demanda	98,7	98,1
20 mg/mL de preparação de manitol a 3,3%	preparação sob demanda	91,3	91,6
20 mg/mL de preparação de manitol a 3,3%	25°C por uma semana	80,5	75,7
20 mg/mL de preparação de manitol a 3,3%	25°C por duas semanas	71,5	65,2
20 mg/mL de preparação de manitol a 3,3%	25°C por 1 mês	63,4	57,2
20 mg/mL de preparação de manitol a 3,3%	25°C por 3 meses	50,2	50,2
2 mg/mL de solução salina fisiológica	37°C por 2 dias	56,9	56,2
2 mg/mL de PBS	37°C por 2 dias	57,2	60,6
20 mg/mL de solução salina fisiológica	37°C por 2 dias	12,1	18,3
20 mg/mL de PBS	37°C por 2 dias	11,3	13,1

Exemplo 5 (Teste de estabilidade da preparação de aptâmero de FGF2)

[092] O aptâmero representado pelo aptâmero ID1 foi dissolvido em solução de manitol a 3,3% ou 3,6% ou 4,9% a uma concentração de 20 mg/mL ou 2 mg/mL, armazenado por 3 meses sob várias condições de temperatura mostradas na Tabela 2 e a porcentagem de teor de monômero e atividade de ligação foram medidas por cromatografia de exclusão por tamanho e pelo método de SPR. Os resultados são mostrados na Tabela 2.

[093] A partir dos resultados, foi esclarecido que uma preparação de aptâmero de FGF2 preparado usando uma solução aquosa de manitol livre de eletrólito é estável.

Tabela 2

Resultados do teste de estabilidade da preparação de aptâmero de FGF2

concentração da preparação (mg/mL)	solução	temperatura de armazenamento	porcentagem de teor de monômero (%)	atividade de ligação (%)
2	manitol a 3,3%	-20°C	98,4	102,0
2	manitol a 3,3%	5°C	99,1	102,7
20	manitol a 3,3%	-20°C	89,2	91,0
20	manitol a 3,3%	5°C	88,5	90,8
2	manitol a 4,9%	-20°C	98,3	101,0
2	manitol a 4,9%	5°C	98,0	103,1
20	manitol a 3,6%	-20°C	88,8	84,1
20	manitol a 3,6%	5°C	88,0	81,8

Exemplo 6 (Resultados em outras preparações de aptâmero de FGF2)

[094] Os aptâmeros representados pelo aptâmero ID2-6 são dissolvidos em água (solução aquosa de manitol), solução salina fisiológica ou PBS a concentrações apropriadas para preparar preparações de aptâmero de FGF2. As preparações de aptâmero de FGF2 respectivamente obtidas são armazenadas sob várias condições de temperatura e temperatura de armazenamento por vários meses e a porcentagem de teor de monômero e a atividade de ligação são medidas por cromatografia de exclusão por tamanho e pelo método de SPR.

aptâmero ID2:

GL2-400TS-C6-

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

aptâmero ID3:

GL2-400TS-C6-

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

aptâmero ID4:

GL2-400TS-C6-

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

aptâmero ID5:

GL2-400TS-C6-

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

aptâmero ID6:

idT-

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

[095] A partir destes resultados, é esclarecido que outras preparações de aptâmero de FGF2 preparadas usando uma solução aquosa de manitol livre de eletrólito também são estáveis.

Exemplo Comparativo 1 (Teste de estabilidade da preparação de aptâmero de FGF2)

[096] O aptâmero representado pelo aptâmero ID1 foi dissolvido em solução salina fisiológica ou PBS a uma concentração de 20 mg/mL para preparar preparações de aptâmero de FGF2. As preparações de

aptâmero de FGF2 respectivamente obtidas foram armazenadas por 3 meses sob várias condições de temperatura mostradas na Tabela 3 e a porcentagem de teor de monômero e a atividade de ligação foram medidas por cromatografia de exclusão por tamanho. Os resultados são mostrados na Tabela 3. A partir dos resultados, foi esclarecido que as preparações de aptâmero de FGF2 preparadas usando solução salina fisiológica e PBS contendo eletrólito são instáveis.

Tabela 3

Resultados do teste de estabilidade de aptâmero de preparações de FGF2 preparadas usando solução contendo eletrólito

concentração da preparação (mg/mL)	solução	temperatura de armazenamento	porcentagem de teor de monômero (%)
20	solução salina fisiológica	-20°C	65,4
20	solução salina fisiológica	5°C	44,5
20	manitol a 3,3%	-20°C	68,2
20	manitol a 3,3%	5°C	36,8

Aplicabilidade Industrial

[097] A preparação de aptâmero da presente invenção pode armazenar estavelmente um aptâmero para FGF2 ou um sal do mesmo por um longo prazo na forma de um líquido aquoso tal como injeção ou similares por refrigeração. Portanto, é extremamente útil que isto pode fornecer uma preparação superior em manejo como um agente terapêutico ou profilático para doenças para as quais a inibição de FGF2 pode exibir eficácia (por exemplo, doenças acompanhadas por angiogênese tais como degeneração macular relacionada à idade e similares, doenças dos ossos ou cartilagens tais como osteoporose,

artrite reumatoide, osteoartrite, fratura óssea e similares, dor).

[098] Este pedido é fundamentado em um pedido de patente Nº 2018-124390 depositado no Japão (data do depósito: 29 de junho de 2018), os conteúdos do qual são incorporados completamente aqui.

REIVINDICAÇÕES

1. Líquido aquoso, caracterizado pelo fato de que compreende um aptâmero ou um sal do mesmo que se liga a FGF2 e um osmorregulador não eletrolítico, em que o aptâmero ou um sal do mesmo é estável por um longo prazo.

2. Líquido aquoso, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o líquido é substancialmente livre de um eletrólito exceto o aptâmero ou um sal do mesmo.

3. Líquido aquoso, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o aptâmero compreende uma sequência de nucleotídeo representada pela fórmula (1) seguinte (em que uracila é opcionalmente timina):



(em que N^1 e N^6 são todos independentemente quaisquer 0 a várias bases, e N^2 , N^3 , N^4 e N^5 são independentemente qualquer uma base),

e é o (a) ou (b) seguinte:

(a) um aptâmero em que, nos nucleotídeos contidos no aptâmero,

(i) a posição 2' da ribose de cada nucleotídeo de pirimidina é um átomo de flúor,

(ii) a posição 2' da ribose de cada nucleotídeo de purina é um grupo hidróxi;

(b) o aptâmero de (a), em que

(i) o átomo de flúor na posição 2' da ribose de cada nucleotídeo de pirimidina é independentemente não substituído, ou substituído por um átomo ou grupo selecionado a partir do grupo consistindo em um átomo de hidrogênio, um grupo hidróxi e um grupo metóxi,

(ii) o grupo hidróxi na posição 2' da ribose de cada

nucleotídeo de purina é independentemente não substituído, ou substituído por um átomo ou grupo selecionado a partir do grupo consistindo em um átomo de hidrogênio, um grupo metóxi e um átomo de flúor.

4. Líquido aquoso, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que o aptâmero compreende uma sequência de nucleotídeo representada pela fórmula (3) seguinte:



(3)

(em que N¹ e N⁶² são todos independentemente quaisquer 0 a várias bases).

5. Líquido aquoso, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que o aptâmero compreende uma sequência de nucleotídeo mostrada na SEQ ID N^o: 3, 8, 9, 10 ou 12.

6. Líquido aquoso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizado pelo fato de que o aptâmero tem uma concentração de 1 a 60 mg/mL.

7. Líquido aquoso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizado pelo fato de que o osmorregulador é combinado em uma proporção de 2 a 7,5 % (p/v) do líquido aquoso integral.

8. Líquido aquoso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizado pelo fato de que o osmorregulador é manitol.

9. Líquido aquoso, de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que o manitol está contido em 1 a 50 mg por 1 mg do aptâmero.

10. Líquido aquoso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, caracterizado pelo fato de que o líquido é armazenado em não mais do que 5°C.

11. Líquido aquoso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10, caracterizado pelo fato de que uma proporção de um aptâmero monomérico é não menos do que 80% depois do armazenamento a 4°C por 3 meses.

12. Líquido aquoso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 11, caracterizado pelo fato de que o líquido é uma injeção.

13. Líquido aquoso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 12, caracterizado pelo fato de que o líquido é para prevenir ou tratar uma doença acompanhada por angiogênese, doença dos ossos ou cartilagens ou dor.

14. Uso de um líquido aquoso como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 12, caracterizado pelo fato de ser na preparação de um medicamento para prevenir ou tratar uma doença acompanhada por angiogênese, doença dos ossos ou cartilagens ou dor.

15. Líquido aquoso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 12, caracterizado pelo fato de que é para o uso na profilaxia ou tratamento de uma doença acompanhada por angiogênese, doença dos ossos ou cartilagens ou dor.

RESUMO

Patente de Invenção: "**PREPARAÇÃO DE APTÂMERO**".

A presente invenção refere-se a formulação de uma preparação por meio da qual a atividade de um aptâmero, em particular, um aptâmero para FGF2 pode ser estavelmente mantida durante um longo período de tempo. Como um resultado também fornecida é uma preparação farmacêutica compreendendo um aptâmero, em particular, um aptâmero para FGF2 como um ingrediente ativo.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas.

Código de Controle

Campo 1



Campo 2



Outras Informações:

- Nome do Arquivo: LISTAGEM DE SEQUÊNCIA 23.12.20 P251259.TXT
- Data de Geração do Código: 23/12/2020
- Hora de Geração do Código: 17:56:52
- Código de Controle:
 - Campo 1: 08E6022CFFB8B552
 - Campo 2: F43DCBBFD2FDA2F4