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

(11) PI 0815094-0 B1

(22) Data do Depósito: 06/08/2008

(45) Data de Concessão: 24/09/2020

(54) Título: ÁCIDOS NUCLEICOS DE LIGAÇÃO DE SDF-1 E O USO DOS MESMOS.

(51) Int.Cl.: C12N 15/11; A61K 31/713.

(30) Prioridade Unionista: 06/08/2007 EP 07 015379.6; 18/06/2008 EP 08 011024.0; 30/04/2008 EP 08 008312.4.

(73) Titular(es): NOXXON PHARMA AG..

(72) Inventor(es): WERNER PURSCHKE; FLORIAN JAROSCH; DIRK EULBERG; KLAUS BUCHNER; CHRISTIAN MAASCH; NICOLE DINSE; SVEN KLUSSMANN.

(86) Pedido PCT: PCT EP2008006473 de 06/08/2008

(87) Publicação PCT: WO 2009/019007 de 12/02/2009

(85) Data do Início da Fase Nacional: 05/02/2010

(57) Resumo: LIGAÇÃO DE MOLÉCULA DE ÁCIDO NUCLEICO A SDF-1, USO DOS MESMOS, MÉTODO PARA OBTENÇÃO DE CÉLULAS PROGENITORAS E/OU CÉLULAS-TRONCO DE UM PRIMEIRO INDIVÍDUO, MÉTODO PARA DEPLEÇÃO DE CÉLULAS DE PLASMA DE LONGA VIDA, MOLÉCULA QUE INIBE A SINALIZAÇÃO ENTRE SDF-1 E O RECEPTOR DE SDF-1 E MOLÉCULA DE LIGAÇÃO DE SDF-1 QUE NÃO ATRAVESSA A BARREIRA HEMATOENCEFÁLICA. A presente invenção refere-se a uma molécula de ácido nucleico que se liga a SDF-1, em que a molécula de ácido nucleico influencia a migração de células.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"USO DE UMA MOLÉCULA DE ÁCIDO L-NUCLEICO LIGADA A SDF-1".**

[0001] A presente invenção refere-se à ligação de moléculas de ácido nucleico que se ligam ao fator-1 derivado de célula estromal de quimiocina CXC (SDF-1), métodos para o tratamento de doenças, e seu uso na fabricação de um medicamento.

Quimiocinas.

[0002] As quimiocinas são uma família de proteínas básicas de ligação de heparina, estruturalmente relacionada, de 8-14 kDa. Funcionalmente, elas podem ser classificadas como função pró-inflamatória, homeostática ou dupla (Moser, Wolf e outros. 2004). As quimiocinas inflamatórias são induzidas por patógenos, citocinas, ou fatores de crescimento e leucócitos efetuadores de recrutamento para locais de infecção, inflamação, dano de tecido, e tumor. Tais quimiocinas regulam o recrutamento, ativação, e proliferação de células de sangue brancas, também referidas como leucócitos (Schall e Bacon 1994; Springer 1995; Baggiolini 1998). As quimiocinas induzem seletivamente quimiotaxia de neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monócitos, macrófagos, células de mastro, células T e B. Em adição a seu efeito quimiotático, elas podem exercer seletivamente outros efeitos em células responsivas similares a mudanças na forma da célula, aumento transiente na concentração de íons de cálcio intracelulares livres, degranulação, regulação ascendente de integrinas, formação de lapídeos bioativos tais como, mas não-limitados a, leucotrienos, prostaglandinas, tromboxanos, ou eclosão respiratória, isto é, liberação de espécie de oxigênio reativo para destruição de organismos patogênicos ou células de tumor. Desse modo, pela provocação da liberação de mediadores pró-inflamatórios adicionais, quimiotaxia e extravazamento de leucócitos para locais de infecção ou inflamação, as quimiocinas disparam a escalada da

resposta inflamatória. As quimiocinas homeostáticas, por outro lado, são expressas predominantemente no medula óssea e tecidos linfoides, e são envolvidas em hematopoiese, vigilância imune, e respostas imunes adaptativas (Godessart 2005).

Classe de quimiocinas.

[0003] Baseado no arranjo dos primeiros dois dos quatro resíduos de cisteína conservados, as quimiocinas são divididas em quatro classes: quimiocinas CC ou □-quimiocinas em que as cisteínas estão em tandem, quimiocinas CXC ou α-quimiocinas, onde elas são separadas por um resíduo de aminoácido adicional, quimiocinas XC ou γ quimiocinas que possuem somente uma ponte de dissulfeto, pelo que linfotactina que é também referida como XCL1 é o único representante até aqui, e CX3C-quimiocinas que caracterizam três resíduos de aminoácido entre as cisteínas com fractalkina ligada à membrana sendo o único membro de classe (Bazan, Bacon e outros. 1997). As quimiocinas usualmente conduzem dois nomes, um que está relacionado foi dado devido a sua função e um que é o nome sistemático, de acordo com as características de sequência.

CXC quimiocinas.

[0004] As CXC quimiocinas agem principalmente nos neutrófilos, em particular aquelas CXC quimiocinas que conduzem a sequência de aminoácido ELR em seu amino terminal. Exemplos de CXC quimiocinas que são ativas nos neutrófilos são IL-8/CXCL8, GROa/CXCLl, GROp7CXCL2, e GROy/CXCL3, NAP-2/CXCL7, ENA-78/CXCL5, SDF-1/CXCL12 e GCP-2/CXCL6. As CXC quimiocinas agem em uma grande variedade de leucócitos, tais como monócitos, macrófagos, eosinófilos, basófilos, bem como linfócitos T e B (Oppenheim, Zachariae e outros. 1991; Miller e Krangel 1992; Baggiolini, Dewald e outros. 1994; Jose, Griffiths-Johnson e outros. 1994; Ponath, Qin e outros. 1996). Exemplos destas são I-309/CCL1;

MCP-1/CCL2, MCP-2/CCL8, MCP-3/CCL7, MCP-4/CCL13, MIP-la/CCL3 e MIP-lp7CCL4, RANTES/CCL5 e eotaxina/CCLll.

Receptores de CXC quimiocina. ((As quimiocinas agem através de receptores que pertencem a uma superfamília de sete receptores acoplados a proteína G que se estende sobre a transmembrana, também referidos como GPCRs) (Murphy, Baggiolini e outros. 2000)).

[0005] Geralmente falando, a quimiocina e as interações de receptor de quimiocina tendem a serem promíscuas em que uma quimiocina pode se ligar a receptores de quimiocina e, inversamente, um receptor de quimiocina simples pode interagir com várias quimiocinas diferentes. Alguns receptores conhecidos para as CXC quimiocinas incluem CXCR1, que se ligam a GROa, GCP-2, e IL-8; CXCR2, que se ligam a quimiocinas incluindo GROa, GROp, GROy, ENA-78, e IL-8; CXCR3, que se ligam a quimiocinas incluindo PF4, MIG, IP-10, e I-TAC; CXCR4 que, desse modo, tem sido encontrado somente para sinal em resposta a SDF-1, e CXCR5, que tem sido mostrados para sinal em resposta a BCA-1 (Godessart 2005). Além do CXCR4, um novo receptor de SDF-1 foi identificado que é referido como RDC1/CXCR7 (Balabanian, Lagane e outros. 2005, Burns, Summers e outros. 2006).

SDF-1.

[0006] O fator-1 derivado de célula estromal (abrev.: SDF-1; sinônimo, CXCL12; PBSF [fator de estimulação de crescimento de célula B]; TPAR-1 [gene 1 suprimido por TPA]; SCYB12; TLSF [fator de estimulação de célula de linfoma tímica]; hIRH [intercrina humana reduzida em hepatomas]) é uma CXC quimiocina angiogênica que não contém o motivo de ELR típico das quimiocinas similares a IL-8 (Salcedo, Wasserman e outros. 1999; Salcedo e Oppenheim 2003) mas se liga e ativa o receptor CXCR4 acoplado a proteína G. A quimiocina foi descoberta por três grupos independentemente, ou por

clonagem de cDNAs que conduz sequências de sinal N-terminal (Tashiro, Tada e outros. 1993), em virtude de sua capacidade de estimular progenitores de célula B precoce quando expressos por linha de célula estromal PA6 (Nagasawa, Kikutani e outros. 1994), ou por isolamento de uma biblioteca de cDNA construída de fibroblastos de embrião de camundongo tratados com a proteína quinase C-ativadora tetra dodecanoil forbol acetato (abrev.: TPA) (Jiang, Zhou e outros. 1994). Como um resultado de união alternativa, existem duas formas de SDF-1, SDF-lα (68 aa) e SDF-ip, que, comparadas a SDF-1, uma transporta cinco resíduos adicionais no C-terminal (Shirozu, Nakano e outros. 1995). A significância biológica destas duas variantes de união não é completamente compreendida.

Sequências de SDF-1.

[0007] A conservação de sequência entre SDF-1 de espécie diferente é notável: SDF-la humana (SEQ.ID. 1) e murina SDF-la (SEQ.ID. 2) são virtualmente idênticas. Existe somente uma mudança conservativa de V para I na posição 18 (Shirozu, Nakano e outros. 1995).

Estrutura de RMN de SDF-1.

[0008] Um modelo de estrutura de RMN existe (acesso de PDB, 1SDF) para SDF-1 [8-68]. SDF-1 foi verificado ser um monômero com uma região N-terminal com distúrbio. As diferenças para outras quimiocinas são encontradas principalmente no acondicionamento do núcleo hidrofóbico e distribuição de carga superficial (Crump, Gong e outros. 1997).

Atividades fisiológicas de SDF-1.

[0009] As atividades fisiológicas de SDF-1: Visto que o receptor de SDF-1 CXCR4 é amplamente expresso nos leucócitos, células dendríticas maturas, células endoteliais, células do cérebro, e megacariócitos, as atividades de SDF-1 são pleiotrópicas. Esta

quimiocina, mais do que qualquer outra desse modo identificada, exibe a faixa mais ampla de funções biológicas, especialmente fora do sistema imune. Os efeitos funcionais mais significantes de SDF-1 são:

Residência e fixação de células epiteliais a locais neovasculares na porção coroide da retina.

[00010] SDF-1 tem se mostrado estar envolvido na residência de células epiteliais ao coroide durante neovascularização no tecido do olho. O papel exato destas células está ainda sob investigação, mas a hipótese publicada é que as células epiteliais são envolvidas na formação de vasos sanguíneos aberrantes (Sengupta, Caballero e outros. 2005).

Células-tronco

[00011] SDF-1 é requerida manter células-tronco e células progenitoras, por exemplo, células progenitoras hematopoiético (usualmente CD34+) na medula óssea do adulto. AMD3100, um antagonista seletivo de CXCR4, pode ser usado para mobilizar as células CD34+ para transplante de célula-tronco hematopoiética. As células CD34+ migram *in vitro* e *in vivo* ao longo de um gradiente de SDF-1 produzido por células estromais (Aiuti, Webb e outros. 1997).

Desenvolvimento e quimiotaxia de célula B.

[00012] SDF-1 suporta proliferação de células pré-B e aumenta o crescimento de progenitores de célula B de medula óssea (Nagasawa, Kikutani e outros. 1994); ela induz migração específica de células pré- e pré-B, enquanto não age como uma quimioatraente significante para células B maturas (D'Apuzzo, Rolink e outros. 1997; Bleul, Schultze e outros. 1998). Presumivelmente, SDF-1 é importante para o posicionamento de células B dentro de tecido linfoide secundário.

Quimiotaxia de célula T.

[00013] SDF-1 é uma das mais eficazes quimioatraentes de célula T; CXCR4 está presente em muitos subconjuntos de célula T (Bleul,

Farzan e outros. 1996).

Desenvolvimento embriônico.

[00014] SDF-1 e seu receptor CXCR4 são essenciais para desenvolvimento embriônico. SDF-1 e CXCR4 eliminam perinatalmente a morte de camundongos; eles exibem defeitos septais ventriculares cardíacos ou desenvolvimento cerebelar anormal em adição a números reduzidos de célula B e progenitores de mieloide (Nagasawa, Hirota e outros. 1996; Ma, Jones e outros. 1998; Zou, Kottmann e outros. 1998). SDF-1 é também requerida para ontogenia normal de desenvolvimento de sangue durante embriogênese (Juarez e Bendall 2004).

Infecção de HIV.

[00015] SDF-1 é capaz de inibir entrada de T-trópico HIV-1 em linhas de célula que suportam CXCR4, e expressão de SDF-1 pode ter um suporte importante na patogênese da AIDS, visto que um polimorfismo no gene SDF-1 humano afeta o começo de AIDS (Bleul, Farzan e outros. 1996).

Outras doenças.

[00016] Níveis de expressão alterados de SDF-1 ou seu receptor CXCR4 ou respostas alteradas para estas moléculas são referidos para estarem associados a muitas doenças humanas, tal como retinopatia (Brooks, Caballero e outros. 2004; Butler, Guthrie e outros. 2005; Meleth, Agron e outros. 2005); câncer de mama (Muller, Homey e outros. 2001; Cabioglu, Sahin e outros. 2005), ovários (Scotton, Wilson e outros. 2002), pâncreas (Koshiba, Hosotani e outros. 2000), tireoide (Hwang, Chung e outros. 2003) e nasofaringe (Wang, Wu e outros. 2005); glioma (Zhou, Larsen e outros. 2002); neuroblastoma (Geminder, Sagi-Assif e outros. 2001); leucemia linfocítica crônica de célula B (Burger, Tsukada e outros. 2000); síndrome de WHIM (Warts, Hypogammaglobulinemia, Infections, Myelokathexis syndrome)

(Gulino, Moratto e outros. 2004; Balabanian, Lagane e outros. 2005; Kawai, Choi e outros. 2005); síndromes de eficácia imunológica (Arya, Ginsberg e outros. 1999; Marechal, Arenzana-Sixfinger e outros. 1999; Soriano, Martinez e outros. 2002); neovascularização patológica (Salvucci, Yao e outros. 2002; Yamaguchi, Kusano e outros. 2003; Grunewald, Avraham e outros. 2006); inflamação (Murdoch 2000; Fedyk, Jones e outros. 2001; Wang, Guan e outros. 2001); esclerose múltipla (Krumbholz, Theil e outros. 2006); artrite reumatoide / osteoartrite (Buckley, Amft e outros. 2000; Kanbe, Takagishi e outros. 2002; Grassi, Cristino e outros. 2004).

Antagonismo de SDF-1 e seu receptor.

[00017] Em ajustes de animal experimentais, os antagonistas de SDF-1 ou se seu receptor tem se comprovado eficiente para bloqueio de crescimento e/ou difusão metastática de células de câncer humanas de origem diferente tais como pâncreas (Guleng, Tateishi e outros. 2005; Saur, Seidler e outros. 2005), cólon (Zeelenberg, Ruuls-Van Stalle e outros. 2003; Guleng, Tateishi e outros. 2005), mama (Muller, Horncy ct al. 2001; Lapteva, Yang e outros. 2005), pulmão (Phillips, Burdick e outros. 2003), glioblastoma e meduloblastoma (Rubin, Kung e outros. 2003), próstata (Sun, Schneider e outros. 2005), osteosarcoma (Perissinotto, Cavalloni e outros. 2005), melanoma (Takenaga, Tamamura e outros. 2004), estômago (Yasumoto, Koizumi e outros. 2006) e mieloma múltiplo (Menu, Asosingh e outros. 2006). Em adição, terapia anti-SDF-1 foi benéfica em modelos de animal na prevenção de neovascularização retiniana (Butler, Guthrie e outros. 2005, Mames, Mattheus e outros. 2006), nefrite (Balabanian, Couderc e outros. 2003) e artrite (Matthys, Hatse e outros. 2001; Tamamura, Fujisawa e outros. 2004; De Klerck, Geboes e outros. 2005). Além disso, AMD3100, um antagonista seletivo de CXCR4, foi usado para mobilizar células CD34+ para transplante de

célula-tronco hematopoiética. As células CD34+ migram *in vitro* e *in vivo* ao longo de um gradiente de SDF-1 produzido por células estromais (Aiuti, Webb e outros. 1997).

SDF-1 e doenças do olho.

[00018] SDF-1 é um desenvolvedor na patologia de doenças da parte posterior do olho tal como retinopatia diabética (abrev. DR) (Fong, Aiello e outros. 2004) e degeneração macular relacionada à idade (abrev. AMD) (Ambati, Anand e outros. 2003). Ambas destas doenças danificam o olho e conduzem a perda gradual da visão culminando em cegueira. O dano ocorre devido ao crescimento inapropriado de vasos sanguíneos na parte posterior do olho, um processo conhecido como neovascularização coroidal (abrev. CNV). Durante CNV, novos vasos sanguíneos que se originam da coroide migra através de uma ruptura na membrana de Bruch no epitélio de pigmento sub-retiniano (abrev. sub-RPE) ou espaço sub-retiniano. Os vasos anormais podem sangrar, também referido como hemorragia intrarretiniana, ou vazar fluido sob a retina. Isto pode deixar cicatrizes e pode elevar a mácula, com distorções na visão.

Retinopatia diabética.

[00019] DR é uma sequela maior da diabetes, ocorrendo frequentemente com ambas diabetes tipo 1 e tipo 2. Existem aproximadamente 16 milhões de diabéticos nos Estados Unidos, com quase 8 milhões tendo alguma forma de DR. Quando retinopatia diabética proliferativa (abrev. PDR) é deixada não-tratada, cerca de 60% dos pacientes ficam cegos em um ou ambos os olhos dentro de 5 anos. Com a elevação alarmante no predomínio de diabetes na América do Norte, Europa e muitos países emergentes, a população de pacientes está crescendo rapidamente. Por exemplo, a incidência de cegueira é 25 vezes mais alta em pacientes com diabetes do que na população geral. Além disso, DR é a causa mais comum de

cegueira em indivíduos de média idade, perfazendo pelo menos 12 por cento de todos os novos casos nos Estados Unidos a cada ano. Os programas de classificação são adequados de modo que a visão de pacientes com diabetes pode ser monitorada e tratamento, tal como é disponível, pode ser distribuído em tempo.

[00020] As causas diretas de DR são muito pouco compreendidas, mas a doença é pensada ter suas origens em uma combinação de fontes: autorregulação prejudicada do fluxo de sangue retiniano; acúmulo de sorbitol dentro das células retinianas; e acúmulo de produtos finais de glicosilação avançados no fluido extracelular. Todos estes fatores estão relacionados diretamente ou indiretamente a hiperglicemia, a abundância de açúcar na corrente sanguínea.

[00021] Os sintomas de DR são similares àqueles de AMD. Os pacientes perdem células na retina e microaneurismas, isto é, derrame de sangue ocorre na membrana de embasamento da retina. Em adição, fator de crescimento endotelial vascular (abrev. VEGF), fator 1 de crescimento similar a Insulina (IGF-1) e outros fatores suportados no sangue, possivelmente incluindo SDF-1, atraem novas células vasculares e encorajam a formação de vasos sanguíneos danificados.

Degeneração macular relacionada à idade.

[00022] AMD destrói uma visão central da pessoa. Os estágios anteriores da doença podem não ser ainda perceptíveis, porque sintomas variam entre pacientes. As vezes um paciente é afetado somente em um olho. Ou a visão pode ser prejudicada em ambos os olhos, mas não significantemente. A doença causa distorção ou falta de percepção de cor. Existe frequentemente um ponto escuro no centro do campo visual.

[00023] A etiologia (isto significa curso) da doença é muito pouco compreendida. AMD é frequentemente relacionada ao envelhecimento da camada externa da retina. As alterações físicas ocorrem no centro

da retina, também conhecido como a mácula, que é a parte da retina responsável pela visão mais aguda.

[00024] A AMD úmida começa como uma sequela à forma seca da doença. Alguns 90% dos pacientes sofrem da forma seca de AMD, que resulta no afinamento dos tecidos da macular e distúrbios em sua pigmentação. O restante tem a forma seca, que envolve neovascularização coroidal e, frequentemente, a formação de um edema macular e retiniano ou hemorragia sub-retiniana. Todos destes podem conduzir a uma rápida deterioração de acuidade visual.

[00025] Já a causa mais comum de cegueira em pessoas com mais de 55 anos de idade, a AMD úmida aflige uma estimativa de 4% a 5% da população dos Estados Unidos com idade de 65-74 e quase 10% destes 75 anos de idade ou mais velhos. Já existem 5 milhões de pessoas nos Estados Unidos com mais de 80 anos de idade que têm esta doença, e outras 5 milhões de pessoas são esperadas serem afetadas até 2020.

Tumores.

[00026] Tumores (incluindo neoplasias sólidas e hematológicas e malignidades) são não apenas massas de células de câncer: infiltração de tumores com células imune é uma característica de câncer. Muitos cânceres humanos têm uma rede de quimiocina complexa que influencia a extensão e fenótipo deste infiltrado, bem como crescimento de tumor, sobrevivência, migração e angiogênese. Muitos tumores sólidos contêm muitas células estromais não-malignas. De fato, as células estromais as vezes excedem em número as células de câncer. As células estromais predominantes que são encontradas em cânceres são macrófagos, linfócitos, células endoteliais e fibroblastos.

SDF-1 em tumores.

[00027] Células de tipos de câncer diferentes têm perfis diferentes

de expressão de receptor de quimiocina, mas o receptor de SDF-1 CXCR4 é mais comumente encontrado em células de tumor de camundongo e homem: células de tumor de pelo menos 23 tipos diferentes de cânceres humanos de origem epitelial, mesenquimal, e hematopoiética expressam CXCR4 (Balkwill 2004) com SDF-1 sendo o único ligante conhecido para CXCR4. À parte da medula óssea e tecido linfoide secundário, onde é constitutivamente expressa, a SDF-1 é encontrada em locais de tumor primários em linfoma (Corcione, Ottonello e outros. 2000) e tumores de cérebro de ambas linhagem neuronal e astrocítica. Além disso, ela está presente em níveis altos em ovário (Scotton, Wilson e outros. 2002) e câncer pancreático (Koshiba, Hosotani e outros. 2000), bem como em locais de metástase na mama (Muller, Homey e outros. 2001) e câncer de tireoide (Hwang, Chung e outros. 2003), neuroblastoma e malignidades hematológicas (Geminder, Sagi-Assif e outros. 2001). Em contraste, a expressão de CXCR4 é baixa ou ausente em seio normal (Muller, Homey e outros. 2001), ovário (Scotton, Wilson e outros. 2002) e epitélio de próstata (Sun, Schneider e outros. 2005).

[00028] Além de CXCR4, novo receptor de SDF-1 foi identificado: RDC1/CXCR7 (Balabanian, Lagane e outros. 2005, Burns, Summers e outros. 2006). Estudos in vitro e in vivo com linhas de célula de câncer de próstata sugerem que alterações na expressão de CXCR7/RDC1 estão associadas a atividades adesivas e invasivas aumentadas em adição a uma vantagem de sobrevivência. Em adição, foi observado que níveis de CXCR7/RDC1 são regulados por CXCR4 (Wang e outros, 2008). Estudos in vitro e in vivo têm mostrado que ambos os receptores para SDF-1, a saber CXCR4 e o CXCR7 promovem crescimento de tumor, metastático potencial e resistência a apoptose (quimioterapia induzida) em um número de tumores, por exemplo, câncer de mama, glioblastomas, câncer de ovário, neuroblastoma,

câncer de pulmão, colorretal e câncer de próstata (Burns e outros, 2006; Li e outros, 2008; Scotton e outros, 2002; Yang e outros, 2008; Zagzag e outros, 2008).

[00029] A expressão de CXCR4 e CXCR7, desse modo, parece ser uma característica geral de vários tumores.

Inibição de sinalização de receptor de quimiocina como uma opção terapêutica no tratamento de câncer.

[00030] A inibição de sinalização de receptor de quimiocina em células de tumor tem o potencial de induzir parada de crescimento ou apoptose, e para prevenir invasão e metástase *in vivo* conforme mostrado pela seguinte evidência: eliminação de CXCR4 por siRNA anula o crescimento de tumor de mama (Lapteva, Yang e outros. 2005); As células de T-hibridoma foram transfectadas com uma construção que previnem expressão de superfície de CXCR4 não podem mais metastatizar para órgãos distantes quando injetadas intravenosamente em camundongos (Zeelenberg, Ruuls-Van Stalle e outros. 2001); em experimentos similares com células colorretais de câncer, metástase de pulmão e fígado foram grandemente reduzidas (Zeelenberg, Ruuls-Van Stalle e outros. 2003); anticorpos anti-CXCR4 inibem a difusão de xenoenxertos de câncer de mama aos nodos de linfa (Muller, Homey e outros. 2001); tratamento de células linfoblastoides com anti-CXCR4 ou anticorpos anti-SDF-1 retardam o crescimento de tumor em camundongos (NOD) /SCID (Bertolini, Dell'Agnola e outros. 2002); anticorpos anti-SDF-1 inibem desenvolvimento de metástase de órgão de câncer de pulmão de célula não-pequena (abrev. NSCLC) (Phillips, Burdick e outros. 2003); administração sistêmica do antagonista CXCR4 AMD3100 (por AnorMED Inc.) inibiu o crescimento de glioblastoma intracraniano e xenoenxertos de meduloblastoma, e apoptose de célula de tumor aumentada dentro de 24 horas (Rubin, Kung e outros. 2003);

anticorpos anti-SDF-1 inibem o crescimento de células de câncer de mama MCF-7 misturadas com os fibroblastos associados ao carcinoma (Orimo, Gupta e outros. 2005); neutralização de CXCR4 com anticorpos bloqueados com metástase de câncer de próstata e crescimento nos locais ósseos (Sun, Schneider e outros. 2005); desenvolvimento de metástase de pulmão após injeção de células de osteosarcoma foi prevenido por administração do antagonista peptídico CXCR4 T134 (Perissinotto, Cavalloni e outros. 2005).

[00031] Autores diferentes chagaram a conclusão que o alvo do eixo SDF-1 / CXCR4 proporciona novas opções terapêuticas para pacientes com câncer:

[00032] Tumores ovarianos humanos expressam fortemente SDF-1 mais, em um nível inferior de VEGF. Ambas proteínas são disparadas por hipóxia no tumor. Concentrações patológicas de qualquer das proteínas sozinhas não foram suficientes para induzir angiogênese in vivo, mas juntas, SDF-1 e VEGF em concentrações patológicas induzem eficientemente e sinergisticamente neovascularização. Desse modo, a interrupção deste eixo sinergístico, preferivelmente do que VEGF sozinho, é uma nova estratégia de antiangiogênese eficaz para tratar câncer (Kryczek, Lange e outros. 2005);

[00033] Linhas de célula de câncer de mama, quando equipadas com a autocrina SDF-1 / trajetória de sinalização de CXCR4, revelam comportamento agressivo. Isto inclui um aumento na invasividade e migração junta com crescimento mais rápido. O eixo de SDF-1 / CXCR4 desse modo proporciona informação importante para prognóstico de natureza agressiva e constitui alvos terapêuticos importantes em câncer de mama humano (Kang, Watkins e outros. 2005);

[00034] A migração e metástase de células de câncer de pulmão de célula pequena (abrev. SCLC) – que expressa altos níveis de CXCR4 -

é regulada por SDF-1. A ativação de CXCR4 promove adesão a células assessorias (tais como células estromais) e moléculas de matriz extracelular dentro do microambiente do tumor. Estas interações adesivas resultam em uma resistência aumentada de células de SCLC a quimioterapia. Como tal, inibidores do eixo de SDF-1 / CXCR4 aumentam a quimiossensibilidade de células de SCLC e conduzem a novas avenidas terapêuticas para pacientes com SCLC (Hartmann, Burger e outros. 2004) e outros tumores.

Sinalização de receptor de quimiocina e tráfego de célula-tronco.

[00035] O eixo de SDF-1 / CXCR4 emerge como um regulador de articulação de tráfego de vários tipos de células-tronco no corpo. Desde que mais se não todas as malignidades originam-se no compartimento de tronco/célula, as células-tronco de câncer também expressam CXCR4 em sua superfície e, como um resultado, o eixo de SDF-1 / CXCR4 é envolvido no direcionamento de seu tráfego/metástase para órgãos que expressam SDF-1 tais como, por exemplo, nodos de linfa, pulmões, fígado e ossos. Em consequência, estratégias objetivadas na modulação do eixo de SDF-1 / CXCR4 têm aplicações clínicas importantes ambos na medicina regenerativa para distribuir células-tronco normais aos tecidos e em oncologia clínica para inibir metástase de células de câncer troncos (Kucia, Reca e outros. 2005).

Mobilização de Célula-tronco.

[00036] Leucócitos, também conhecidos como células de sangue brancas, incluem neutrófilos, macrófagos, eosinófilos, basófilos/células de mastro, células B e células T. As células de sangue brancas são continuamente substituídas via o sistema hematopoiético, pela ação de fatores de estimulação de colônia (CSFs) e várias citocinas nas células-tronco e células progenitoras em tecidos hematopoiéticos. O mais amplamente conhecido destes fatores é fator de estimulação de

colônia de granulócito (abrev. G-CSF) que foi aprovado para uso em contra-ação dos efeitos negativos de quimioterapia por estimulação da produção de células de sangue brancas e células progenitoras (mobilização de célula-tronco de sangue periférico). Existem um número de antígenos de célula de superfície que são usados como marcadores para a caracterização da população de célula-tronco e progenitora. Estes marcadores são também sujeitos à mudança, sempre que novos marcadores mais específicos são descobertos. Células-tronco hematopoiéticas são atualmente caracterizadas por serem CD34+, c-kit+, Sca-1+, CD45+, lin-, e CD38- (CD 38 é também um marcador de linhagem, este é, portanto, redundante para lin"). a medula óssea é também um hospedeiro para vários outros tipos de célula-tronco que não são hematopoiéticas, mas podem dar ocorrência a outros tipos de célula e tecidos: Células-tronco mesenquimais são caracterizadas como CD34+, Sca-1+, lin-, BMPR+ e/ou STRO-1+, células-tronco comprometidas por tecido de medula óssea: são atualmente definidos como sendo CXCR4+, CD34+, CD45-. Subpopulações das células-tronco comprometidas com tecido de medula óssea são (Majka e outros. 2005):

células-tronco esqueletais: Myf5+, MyoD+
células-tronco cardíacas: NKx2.5+, GATA4+
células-tronco do fígado: CK19+, <x-fetoproteína+
células-tronco neurais: nestina+, GATA4+

[00037] Vários outros fatores foram reportados para aumentar células de sangue brancas e células progenitoras em ambos indivíduos humanos e animais. Estes agentes incluem fator de estimulação de colônia de granulócito-macrófago (abrev. GM-CSF), Interleukin-1 (abrev. IL-1), Interleukin-3 (abrev. IL-3), Interleukin-8 (abrev. IL-8), PIXY-321 (abrev. Protepina de fusão GM-CSF/IL-3), protepina inflamatória de mcrófago (abrev. MIP), GRO (3 (CXCL2) e

GROpT (CXCL2A4), fator de célula-tronco, trombopoietin e oncogene relacionada ao crescimento, como agentes simples ou em combinação (Broxmeyer, Benninger e outros. 1995; Glaspy, Davis e outros. 1996; Rosenfeld, Bolwell e outros. 1996; Glaspy, Shpall e outros. 1997; Vadhan-Raj, Murray e outros. 1997; Broxmeyer, Orazi e outros. 1998; Dale, Liles e outros. 1998; Pruijt, Willemze e outros. 1999; King, Horowitz e outros. 2001).

[00038] Enquanto fatores de crescimento endógenos são farmacologicamente eficazes, as desvantagens bem-conhecidas de emprego de proteínas e peptídeos como farmacêuticos sublinham a necessidade de adicionar ao repertório de tais fatores de crescimento agentes adicionais que são eficazes à medida que, isto é, aumenta as células progenitoras de leucócitos e células-tronco, respectivamente, preferivelmente aumenta o nível destas no sangue periférico de um indivíduo. Consequentemente, um problema básico do presente pedido é proporcionar meios e métodos para aumentar as células progenitoras de leucócitos e células-tronco, respectivamente, mais especificamente para aumentar o nível destas no sangue periférico de um indivíduo. Um outro problema básico do presente pedido é proporcionar meios e métodos para o tratamento de doenças que são causadas por, ou estão associadas ao baixo nível de células progenitoras de leucócitos e células-tronco, respectivamente.

[00039] As células-tronco são, ou mobilizadas de modo a capacitar diretamente o reparo de tecidos danificados no mesmo paciente em que elas são mobilizadas, ou elas são mobilizadas e coletadas de um doador equiparado ao antígeno de leucócito humano (HLA) e administradas ao paciente intravenosamente ou diretamente em um tecido afetado. O último pode também ser feito com células-tronco que foram mobilizadas a partir do próprio paciente. Antes da administração das células-tronco, elas podem ser expandidas/ou diferenciadas in

vitro.

Doenças da via aérea alérgica e alergias de contato.

[00040] SDF-1 foi verificado agir como um agente quimiotático nas células-tronco maturas e precursoras - especialmente quando histamina é liberada das células-tronco maturas, por exemplo, por sinalização de IgE através de ligação ao receptor Fc-epsilon na superfície da célula-tronco (Godot, Arock e outros. 2007). Em um modelo de camundongo de doença da via aérea alérgica, neutralização mediada por anticorpo de CXCR4, que é expressa nos leucócitos conforme esboçado acima, reduziu a hipersensibilidade da via aérea. Os anticorpos também reduzem a eosinofilia do pulmão, particularmente no fluido de lavagem broncoalveolar e interstício, pela metade, indicando que sinais mediados por CXCR4 contribuem para inflamação do pulmão. A neutralização de SDF-la resultou em uma redução similar em ambas inflamação alérgica do pulmão e hipersensibilidade da via aérea (Gonzalo, Lloyd e outros. 2000). Existe também evidência que SDF-1 contribui para angiogênese. Isto foi explicitamente mostrado por Hoshin e outros. em asma por análise de biópsia bronquial para angiogênese e expressão de SDF-1. Imuno-histoquímica em seções destas biópsias mostraram que indivíduos asmáticos tinham grau mais alto de vascularidade e um maior número de células positivas de SDF-1 comparado a indivíduos de controle (Hoshino, Aoike e outros. 2003).

[00041] Além disso, evidência clínica e experimental indica que os leucócitos de infiltração de pele desempenham um papel crucial na iniciação e manutenção de dermatite atópica, e tem mostrado que SDF-1 é um fator importante para o recrutamento de T-linfócitos e células dendríticas, especialmente células dendríticas tipo Langerhans (Gombert, Dieu-Nosjean e outros. 2005).

Psoríase.

[00042] A psoríase é uma doença inflamatória da pele com um componente básico autoimune. A psoríase é caracterizada por forte infiltração de leucócito da pele afetada, com células T desempenhando um papel proeminente. Zhou e outros. verificou entre outros uma expressão aumentada de SDF-1 mRNA em lesões de pele psoriátrica (Zhou, Krueger e outros. 2003).

Inflamação de junta.

[00043] Existe uma evidência na literatura para o envolvimento do eixo de SDF-1-CXCL4 na inflamação da junta. Matthys e outros. mostraram que AMD3100, um antagonista potente e específico de CXCR4, inibe inflamação da junta autoimune em camundongos deficientes de receptor de IFN-gama (Matthys, Hatse e outros. 2001). A expressão de SDF-1 foi também observada em biópsias sinoviais e por RT-PCR de indivíduos afetados por espondiloartropatia, artrite reumatoide, artrite psoriátrica e doença de junta degenerativa (osteoartrite). Contudo, sobre expressão não foi vista em todos os casos (Gu, Marker-Hermann e outros. 2002). Resultados similares foram encontrados para CXCR4 usando RT-PCR.

Artrite reumatoide.

[00044] Mais recentemente, níveis de SDF-1 foram encontrados para serem aumentados no fluido sinovial de pacientes com artrite reumatoide comparados a pacientes com osteoartrite (Kim, Cho e outros. 2007). Os autores também descreveram que em cultura de célula, a expressão de SDF-1 de cinoviócitos similares a fibroblasto regulada ascendentemente por cocultura destas células com células T. Este efeito foi também observado por adição de IL-17, uma citocina de célula T, ao meio de cultura.

[00045] A imuno-histoquímica nas seções de biópsia de junta revelou que SDF-1 é expressa no sinovio de juntas afetadas por artrite psoriátrica. Aperfeiçoamento clínico rápido e significante foi observado

após tratamento com infliximab em todos os 9 pacientes. Isto foi acompanhado por uma redução de níveis sinoviais de SDF-1 contra outros fatores de crescimento (biópsias foram tomadas após 8 semanas de terapia) (Gu, Marker-Hermann e outros. 2002).

[00046] Enquanto existem manifestações que infiltração de leucócito é característica para doenças alérgicas, reações alérgicas e inflamação em doenças autoimunes, nenhum tratamento eficaz par tais doenças pode ser desenvolvido. Agentes adicionais que afetam o curso de tais doenças, e preferivelmente afetam a infiltração de leucócito, são necessárias. Consequentemente, um problema adicional básico do presente pedido é proporcionar meios e métodos para inibir ou reduzir a infiltração de leucócitos nos tecidos. Um problema adicional básico do presente pedido é proporcionar meios e métodos para o tratamento de doenças que são causadas por ou são associadas à infiltração de leucócitos nos tecidos, ou com um nível aumentado de infiltração de tais leucócitos nos tecidos.

[00047] A sinalização de SDF-1 e seu receptor afeta a migração de células dentro do corpo, preferivelmente de um tecido em outro tecido, de um tecido no sangue periférico e/ou do sangue periférico em um tecido, conduzindo a várias doenças e distúrbios. Uma interferência específica, preferivelmente inibição de interação entre SDF-1 e o receptor de SDF-1 ou receptores, pode causar melhora de várias doenças e distúrbios. Em vista do acima, um problema ainda adicional mais geral básico do presente pedido é proporcionar meios e métodos para afetar a migração de células dentro do corpo, preferivelmente de um tecido para outro tecido, de um tecido no sangue periférico e/ou do sangue periférico em um tecido, pelo que tal migração conduz a ou está associada com várias doenças e distúrbios. Um outro problema adicional básico do presente pedido é proporcionar meios e métodos que são causados por ou associados à migração de células dentro do

corpo, preferivelmente de um tecido para outro tecido, de um tecido no sangue periférico e/ou do sangue periférico em um tecido, conduzindo a várias doenças e distúrbios.

[00048] O problema básico do presente pedido é solucionado pela matéria objeto das reivindicações independentes. Concretizações preferidas podem ser tomadas a partir das reivindicações dependentes.

[00049] Mais especificamente, o problema básico do presente pedido é solucionado em um primeiro aspecto por uma ligação de molécula de ácido nucleico a SDF-1, pelo que a molécula de ácido nucleico influencia migração de células.

[00050] Em uma primeira concretização do primeiro aspecto, as células expressam um receptor de SDF, pelo que o receptor de SDF-1 é um preferivelmente selecionado de CXCR4 e CXCR7.

[00051] Em uma segunda concretização do primeiro aspecto, que é também uma concretização da primeira concretização do primeiro aspecto, a migração de células compreende mobilização de células progenitoras, células-tronco, células de câncer, células de plasma de longa vida, células B e/ou células T no sangue periférico de um indivíduo, pelo que preferivelmente as células B e/ou células T são células B de memória e/ou células T de memória.

[00052] Em uma terceira concretização do primeiro aspecto, que é também uma concretização da segunda concretização do primeiro aspecto, as células progenitoras e/ou as células-tronco compreendem células progenitoras CD34+.

[00053] Em uma quarta concretização do primeiro aspecto, que é também uma concretização da segunda e terceira concretização do primeiro aspecto, a mobilização das células progenitoras e/ou das células-tronco ocorre em um tecido hematopoiético.

[00054] Em uma quinta concretização do primeiro aspecto, que é

também uma concretização da quarta concretização do primeiro aspecto, o tecido hematopoiético é pelo menos um de tecido mieloide e tecido linfoide, pelo que preferivelmente o tecido mieloide está localizado na medula óssea, e preferivelmente o tecido linfoide está localizado na mucosa do trato digestivo, do trato respiratório, dos nodos de linfa, do baço, do timo e/ou dos folículos linfoides em um tecido inflamado.

[00055] Em uma sexta concretização do primeiro aspecto, a molécula de ácido nucleico inibe migração de leucócitos.

[00056] Em uma sétima concretização do primeiro aspecto, que é também uma concretização da sexta concretização do primeiro aspecto, os leucócitos são T-linfócitos, B-linfócitos, monócitos, macrófagos, eosinófilos, neutrófilos, basófilos, células dendríticas e/ou células de mastro.

[00057] Em uma oitava concretização do primeiro aspecto, que é também uma concretização da sexta e sétima concretização do primeiro aspecto, após migração dos leucócitos, os leucócitos são acumulados em um tecido, pelo que preferivelmente o acúmulo dos leucócitos conduz a uma inflamação no referido tecido.

[00058] Em uma nona concretização do primeiro aspecto, que é também uma concretização da oitava concretização do primeiro aspecto, o tecido compreende pele, mucosa, órgãos conforme selecionados, mas não restritos a, olho, cérebro, pulmão, rins, coração, fígado, trato gastrointestinal, baço, ossos e/ou sistema linfático, preferivelmente pele e/ou a mucosa de vias aéreas.

[00059] Em uma décima concretização do primeiro aspecto, que é também uma concretização do primeiro aspecto e de qualquer da primeira a nona concretização do primeiro aspecto, a molécula de ácido nucleico é selecionada do grupo compreendendo moléculas de ácido nucleico tipo A, moléculas de ácido nucleico tipo B, moléculas de

ácido nucleico tipo C, e moléculas de ácido nucleico tendo uma sequência de ácido nucleico de acordo com qualquer das SEQ ID NO: 142, SEQ ID NO: 143 e SEQ ID NO: 144.

[00060] Em uma décima primeira concretização do primeiro aspecto, que é também uma concretização da décima concretização do primeiro aspecto, as moléculas de ácido nucleico tipo A compreendem a seguinte sequência nucleotídeo de núcleo:

5' AAAGYRACAHGUMAAXaUGAAAGGUARC 3' (SEQ ID NO: 19) pelo que X_A é ou ausente ou é A.

[00061] Em uma décima segunda concretização do primeiro aspecto, que é também uma concretização da décima primeira concretização do primeiro aspecto, as moléculas de ácido nucleico tipo A compreendem uma sequência nucleotídeo de núcleo selecionada do grupo compreendendo

5' AAAGYRACAHGUMAAUGAAAGGUARC 3' (SEQ ID NO: 20),

5' AAAGYRACAHGUMAAAUGAAAGGUARC 3' (SEQ ID NO: 21), e

5' AAAGYAACAHGUCAAUGAAAGGUARC 3' (SEQ ID NO: 22), preferivelmente a sequência de nucleotídeo de núcleo compreende 5' AAAGYAACAHGUCAAUGAAAGGUARC 3' (SEQ ID NO: 22).

[00062] Em uma décima terceira concretização do primeiro aspecto, que é também uma concretização da décima primeira e da décima segunda concretização do primeiro aspecto, a molécula de ácido nucleico compreende na direção 5'->3' uma primeira extensão de nucleotídeos, a sequência nucleotídeo de núcleo, e uma segunda extensão de nucleotídeos.

[00063] Em uma décima quarta concretização do primeiro aspecto, que é também uma concretização da décima primeira e da décima

segunda concretização do primeiro aspecto, a molécula de ácido nucleico compreende na direção 5'->3' uma segunda extensão de nucleotídeos, a sequência nucleotídeo de núcleo, e uma primeira extensão de nucleotídeos.

[00064] Em uma décima quinta concretização do primeiro aspecto, que é também uma concretização da décima terceira e da décima quarta concretização do primeiro aspecto, a molécula de ácido nucleico compreende a primeira e a segunda extensão de nucleotídeos e referida primeira e referida segunda extensão de nucleotídeos opcionalmente hibridizam uma com a outra, pelo que após hibridização, uma estrutura de fita duplo é formada.

[00065] Em uma décima sexta concretização do primeiro aspecto, que é também uma concretização de qualquer da décima terceira a décima quinta concretização do primeiro aspecto, a estrutura de fita duplo consiste em quatro a seis pares de base, preferivelmente cinco pares de base.

[00066] Em uma décima sétima concretização do primeiro aspecto, que é também uma concretização de qualquer da décima terceira a décima sexta concretização do primeiro aspecto, a primeira extensão de nucleotídeos compreende uma sequência de nucleotídeo de ' X1X2NNBV 3' (SEQ ID NO: 44), e a segunda extensão de nucleotídeos compreende uma sequência de nucleotídeo de 5' BNBNX3X4 3' (SEQ ID NO: 45)

pelo que Xi é ou ausente ou R, X2 é S, X3 é S e X4 é ou ausente ou Y;

ou

Xi é ausente, X2 é ou ausente ou S, X3 é ou ausente ou S, e X4 é ausente.

[00067] Em uma décima oitava concretização do primeiro aspecto, que é também uma concretização de qualquer da décima terceira a

décima sétima concretização do primeiro aspecto, a primeira extensão de nucleotídeos compreende uma sequência de nucleotídeo de 5' RSHRYR3' (SEQ ID NO: 23), e a segunda extensão de nucleotídeos compreende uma sequência de nucleotídeo de 5' YRYDSY 3'(SEQ ID NO: 24), preferivelmente a primeira extensão de nucleotídeos compreende uma sequência de nucleotídeo de 5' GCUGUG 3', e a segunda extensão de nucleotídeos compreende uma sequência de nucleotídeo de 5' CGCAGC 3'.

[00068] Em uma décima nona concretização do primeiro aspecto, que é também um concretização de qualquer da décima terceira a décima sétima concretização do primeiro aspecto, a primeira extensão de nucleotídeos compreende uma sequência de nucleotídeo de 5' X2BBBS 3' (SEQ ID NO: 42), e a segunda extensão de nucleotídeos compreende uma sequência de nucleotídeo de 5' SBBVX3 3' (SEQ ID NO: 43),

pelo que X2 é ou ausente ou é S, e X3 é ou ausente ou é S;

preferivelmente a primeira extensão de nucleotídeos compreende uma sequência de nucleotídeo de 5' CUGUG 3', e a segunda extensão de nucleotídeos compreende uma sequência de nucleotídeo de 5' CGCAG 3';

ou a primeira extensão de nucleotídeos compreende uma sequência de nucleotídeo de 5' GCGUG3', e a segunda extensão de nucleotídeos compreende uma sequência de nucleotídeo de 5' CGCGC 3'.

[00069] Em uma vigésima concretização do primeiro aspecto, que é também uma concretização de qualquer da décima primeira a décima nona concretização do primeiro aspecto, a molécula de ácido nucleico tem uma sequência de ácido nucleico de acordo com qualquer das SEQ ID NOs: 5 a 18, 25 a 41, 133, 137, 139 a 141.

[00070] Em uma vigésima primeira concretização do primeiro

aspecto, que é também uma concretização da vigésima concretização do primeiro aspecto, as moléculas de ácido nucleico de tipo B compreendem a seguinte sequência nucleotídeo de núcleo:

5' GUGUGAUCUAGAUGUADWGGCUGWUCCUAGUYAGG3' (SEQ ID NO: 57).

[00071] Em uma vigésima segunda concretização do primeiro aspecto, que é também uma concretização da vigésima primeira concretização do primeiro aspecto, as moléculas de ácido nucleico de tipo B compreendem uma sequência nucleotídeo de núcleo de GUGUGAUCUAGAUGUADUGGCUGAUCCUAGUCAGG (SEQ ID NO: 58):

[00072] Em uma vigésima terceira concretização do primeiro aspecto, que é também uma concretização de qualquer da vigésima primeira a vigésima segunda concretização do primeiro aspecto, as molécula de ácido nucleico compreende na direção 5'->3' uma primeira extensão de nucleotídeos, a sequência nucleotídeo de núcleo, e uma segunda extensão de nucleotídeos.

[00073] Em uma vigésima quarta concretização do primeiro aspecto, que é também uma concretização de qualquer da vigésima primeira a vigésima segunda concretização do primeiro aspecto, a molécula de ácido nucleico compreende na direção 5'->3' uma segunda extensão de nucleotídeos, a sequência nucleotídeo de núcleo, e uma primeira extensão de nucleotídeos.

[00074] Em uma vigésima quinta concretização do primeiro aspecto, que é também uma concretização de qualquer da vigésima terceira a vigésima quarta concretização do primeiro aspecto, a molécula de ácido nucleico compreende a primeira e a segunda extensão de nucleotídeos, e referida primeira e referida segunda extensão de nucleotídeos opcionalmente hibridizam uma com a outra, pelo que após hibridização, uma estrutura de fita duplo é formada.

[00075] Em uma vigésima sexta concretização do primeiro aspecto, que é também uma concretização de qualquer da vigésima primeira a vigésima quinta concretização do primeiro aspecto, a estrutura de fita duplo consiste em quatro a seis pares de base, preferivelmente cinco pares de base.

[00076] Em uma vigésima sétima concretização do primeiro aspecto, que é também uma concretização de qualquer da vigésima terceira a vigésima sexta concretização do primeiro aspecto, a primeira extensão de nucleotídeos compreende uma sequência de nucleotídeo de 5' XiX_2SVNS 3' (SEQ ID NO: 77), e a segunda extensão de nucleotídeos compreende uma sequência de nucleotídeo de 5' BVBSX3X4 3' (SEQ ID NO: 78), pelo que Xi é ou ausente ou é A, X2 é G, X3 é C e X4 é ou ausente ou é U;

ou

Xi é ausente, X2 é ou ausente ou é G, X3 é ou ausente ou é C e X4 é ausente.

[00077] Em uma vigésima oitava concretização do primeiro aspecto, que é também uma concretização de qualquer da vigésima terceira a vigésima sétima concretização do primeiro aspecto, a primeira extensão de nucleotídeos compreende uma sequência de nucleotídeo de 5' XiGCRWG 3' (SEQ ID NO: 59), e a segunda extensão de nucleotídeos compreende uma sequência de nucleotídeo de 5' KRYSCX4 3'(SEQ ID NO: 60),

pelo que Xi é ou ausente ou A, e X4 é ou ausente ou U.

[00078] Em uma vigésima nona concretização do primeiro aspecto, que é também uma concretização de qualquer da vigésima terceira a vigésima oitava concretização do primeiro aspecto, a primeira extensão de nucleotídeos compreende uma sequência de nucleotídeo de 5' XiGCGUG 3' (SEQ ID NO: 75), e a segunda extensão de nucleotídeos compreende uma sequência de nucleotídeo de

5MJACGCX4 3' (SEQ ID NO: 76),

pelo que Xi é ou ausente ou A, e X4 é ou ausente ou U,

preferivelmente a primeira extensão de nucleotídeos compreende uma sequência de nucleotídeo de 5' AGCGUG 3', e a segunda extensão de nucleotídeos compreende uma sequência de nucleotídeo de 5' UACGCU 3'.

[00079] Em uma trigésima concretização do primeiro aspecto, que é também uma concretização de qualquer da vigésima terceira a vigésima sétima concretização do primeiro aspecto, a primeira extensão de nucleotídeos compreende uma sequência de nucleotídeo de 5' X2SSBS 3' (SEQ ID NO: 73), e a segunda extensão de nucleotídeos compreende uma sequência de nucleotídeo de 5' BVSSX3 3' (SEQ ID NO: 74),

pelo que X2 é ou ausente ou G, e X3 é ou ausente ou C,

preferivelmente a primeira extensão de nucleotídeos compreende uma sequência de nucleotídeo de 5' GCGUG 3', e a segunda extensão de nucleotídeos compreende uma sequência de nucleotídeo de 5' UACGC 3'.

[00080] Em uma trigésima primeira concretização do primeiro aspecto, que é também uma concretização de qualquer da vigésima primeira a trigésima concretização do primeiro aspecto, a molécula de ácido nucleico tem uma sequência de ácido nucleico de acordo com qualquer das SEQ ID NOs: 46 a 56, 61 a 72, e 132.

[00081] Em uma trigésima segunda concretização do primeiro aspecto, que é também uma concretização da décima concretização do primeiro aspecto, as moléculas de ácido nucleico de tipo C compreendem uma sequência nucleotídeo de núcleo de GGUYAGGGCUHRX$_A$AGUCGG (SEQ ID NO: 90),

pelo que X$_A$ é ou ausente ou é A.

[00082] Em uma trigésima terceira concretização do primeiro

aspecto, que é também uma concretização da trigésima segunda concretização do primeiro aspecto, as moléculas de ácido nucleicos de tipo C compreendem uma sequência nucleotídeo de núcleo selecionada do grupo compreendendo

5' GGUYAGGGCUHRAAGUCGG3' (SEQ ID NO: 91),

5' GGUYAGGGCUHRAGUCGG 3' (SEQ ID NO: 92), e

5' GGUUAGGGCUHGAAGUCGG 3' (SEQ ID NO: 93), preferivelmente a sequência nucleotídeo de núcleo compreende 5' GGUUAGGGCUHGAAGUCGG 3' (SEQ ID NO: 93).

[00083] Em uma trigésima quarta concretização do primeiro aspecto, que é também uma concretização de qualquer da trigésima segunda a trigésima terceira concretização do primeiro aspecto, a molécula de ácido nucleico compreende na direção 5'->3' uma primeira extensão de nucleotídeos, a sequência nucleotídeo de núcleo, e uma segunda extensão de nucleotídeos.

[00084] Em uma trigésima quinta concretização do primeiro aspecto, que é também uma concretização de qualquer da trigésima segunda a trigésima terceira concretização do primeiro aspecto, a molécula de ácido nucleico compreende na direção 5'->3' uma segunda extensão de nucleotídeos, a sequência nucleotídeo de núcleo, e uma primeira extensão de nucleotídeos.

[00085] Em uma trigésima sexta concretização do primeiro aspecto, que é também uma concretização de qualquer da trigésima quarta a trigésima quinta concretização do primeiro aspecto, a molécula de ácido nucleico compreende a primeira e a segunda extensão de nucleotídeos, e pelo que pelo menos uma parte de referida primeira extensão e pelo menos uma parte de referida segunda extensão de nucleotídeos opcionalmente hibridizam uma com a outra, pelo que, após hibridização, uma estrutura de fita duplo é formada.

[00086] Em uma trigésima sétima concretização do primeiro

aspecto, que é também uma concretização de qualquer da trigésima quarta a trigésima sexta concretização do primeiro aspecto, o comprimento da primeira extensão e o comprimento da segunda extensão é individualmente e independentemente 0 a 17 nucleotídeos, preferivelmente 4 a 10 nucleotídeos e, mais preferivelmente, 4 a 6 nucleotídeos.

[00087] Em uma trigésima oitava concretização do primeiro aspecto, que é também uma concretização de qualquer da trigésima sexta a trigésima sétima concretização do primeiro aspecto, a estrutura de fita duplo compreende 4 a 10 pares de base, preferivelmente 4 a 6 pares de base, mais preferivelmente 5 pares de base.

[00088] Em uma trigésima nona concretização do primeiro aspecto, que é também uma concretização da trigésima oitava concretização do primeiro aspecto, a estrutura de fita duplo compreende 4 a 10 pares de base consecutivos, preferivelmente 4 a 6 pares de base consecutivos, mais preferivelmente 5 pares de base consecutivos.

[00089] Em uma quadragésima concretização do primeiro aspecto, que é também uma concretização de qualquer da trigésima quarta a trigésima nona concretização do primeiro aspecto, a primeira extensão de nucleotídeos compreende uma sequência de nucleotídeo de 5'RKSBUSNVGR3' (SEQ ID NO: 120), e a segunda extensão de nucleotídeos compreende uma sequência de nucleotídeo de 5' YYNRCASSMY 3' (SEQ ID NO: 121), preferivelmente a primeira extensão de nucleotídeos compreende uma sequência de nucleotídeo de 5'RKSBUGSVGR3' (SEQ ID NO: 122), e a segunda extensão de nucleotídeos compreende uma sequência de nucleotídeo de 5' YCNRCASSMY 3' (SEQ ID NO: 123).

[00090] Em uma quadragésima primeira concretização do primeiro aspecto, que é também uma concretização de qualquer da trigésima

quarta a trigésima nona concretização do primeiro aspecto, a primeira extensão de nucleotídeos compreende uma sequência de nucleotídeo de 5' XsSSSV 3' (SEQ ID NO: 124), e a segunda extensão de nucleotídeos compreende uma sequência de nucleotídeo de 5' BSSSX_S 3' (SEQ ID NO: 125), pelo que X_s é ou ausente ou é S.

[00091] Em uma quadragésima segunda concretização do primeiro aspecto, que é também uma concretização de qualquer da trigésima nona a quadragésima primeira concretização do primeiro aspecto, a primeira extensão de nucleotídeos compreende uma sequência de nucleotídeo de 5' SSSSR3' (SEQ ID NO: 130), e a segunda extensão de nucleotídeos compreende uma sequência de nucleotídeo de 5' YSBSS 3' (SEQ ID NO: 131), preferivelmente a primeira extensão de nucleotídeos compreende uma sequência de nucleotídeo de 5' SGGSR3' (SEQ ID NO: 126), e a segunda extensão de nucleotídeos compreende uma sequência de nucleotídeo de 5' YSCCS 3' (SEQ ID NO: 127).

[00092] Em uma quadragésima terceira concretização do primeiro aspecto, que é também uma concretização de qualquer da trigésima quarta a trigésima nona e quadragésima segunda concretização do primeiro aspecto, a primeira extensão de nucleotídeos compreende uma sequência de nucleotídeo de 5' GCSGG 3' (SEQ ID NO: 128), e a segunda extensão de nucleotídeos compreende uma sequência de nucleotídeo de 5' CCKGC 3' (SEQ ID NO: 129), preferivelmente a primeira extensão de nucleotídeos compreende uma sequência de nucleotídeo de 5' GCCGG 3', e a segunda extensão de nucleotídeos compreende uma sequência de nucleotídeo de 5' CCGGC 3'.

[00093] Em uma quadragésima quarta concretização do primeiro aspecto, que é também uma concretização de qualquer da trigésima quarta a trigésima nona concretização do primeiro aspecto, a primeira extensão de nucleotídeos compreende uma sequência de nucleotídeo

de 5' CGUGCGCUUGAGAUAGG 3', e a segunda extensão de nucleotídeos compreende uma sequência de nucleotídeo de 5' CUGAUUCUCACG 3'.

[00094] Em uma quadragésima quinta concretização do primeiro aspecto, que é também uma concretização de qualquer da trigésima quarta a trigésima nona concretização do primeiro aspecto, a primeira extensão de nucleotídeos compreende uma sequência de nucleotídeo de 5' UGAGAUAGG 3', e a segunda extensão de nucleotídeos compreende uma sequência de nucleotídeo de 5'CUGAUUCUCA3'.

[00095] Em uma quadragésima sexta concretização do primeiro aspecto, que é também uma concretização de qualquer da trigésima quarta a trigésima nona concretização do primeiro aspecto, a primeira extensão de nucleotídeos compreende uma sequência de nucleotídeo de 5' GAGAUAGG 3', e a segunda extensão de nucleotídeos compreende uma sequência de nucleotídeo de 5' CUGAUUCUC 3'.

[00096] Em um quadragésima sétima concretização do primeiro aspecto, que é também uma concretização de qualquer da trigésima segunda a quadragésima sexta concretização do primeiro aspecto, a molécula de ácido nucleico tem uma sequência de ácido nucleico de acordo com qualquer das SEQ ID NOs: 79 a 89, 94 a 119, e 134 a 136.

[00097] Em uma quadragésima oitava concretização do primeiro aspecto, que é também uma concretização da décima concretização do primeiro aspecto, a molécula de ácido nucleico tem uma sequência de ácido nucleico de acordo com qualquer das SEQ ID NOs: 142 a 144.

[00098] Em uma quadragésima nona concretização do primeiro aspecto, que é também uma concretização do primeiro aspecto e de qualquer da primeira a quadragésima oitava concretização do primeiro aspecto, a molécula de ácido nucleico é uma antagonista para SDF-1.

[00099] Em uma quinquagésima concretização do primeiro aspecto, que é também uma concretização do primeiro aspecto e de qualquer da primeira a quadragésima oitava concretização do primeiro aspecto, a molécula de ácido nucleico é uma antagonista do sistema de receptor de SDF-1, pelo que o receptor de SDF-1 do sistema de receptor de SDF-1 é um preferivelmente selecionado de CXCR4 e CXCR7.

[000100] Em uma quinquagésima primeira concretização do primeiro aspecto, que é também uma concretização do primeiro aspecto e de qualquer da primeira a quinquagésima concretização do primeiro aspecto, a SDF-1 é uma SDF-1 humana e/ou o receptor de SDF-1 do sistema de receptor de SDF-1 é um receptor de SDF-1 humano.

[000101] Em uma quinquagésima segunda concretização do primeiro aspecto, que é também uma concretização do primeiro aspecto e de qualquer da primeira a quinquagésima primeira concretização do primeiro aspecto, SDF-1 compreende uma sequência de aminoácido de acordo com SEQ ID NO: 1.

[000102] Em uma quinquagésima terceira concretização do primeiro aspecto, que é também uma concretização do primeiro aspecto e de qualquer da primeira a quinquagésima segunda concretização do primeiro aspecto, o ácido nucleico compreende uma modificação.

[000103] Em uma quinquagésima quarta concretização do primeiro aspecto, que é também uma concretização da quinquagésima terceira concretização do primeiro aspecto, a modificação é selecionada do grupo compreendendo uma porção de HES e uma porção de PEG.

[000104] Em uma quinquagésima quinta concretização do primeiro aspecto, que é também uma concretização da quinquagésima quarta concretização do primeiro aspecto, a modificação é uma porção de PEG consistindo em um PEG reto ou ramificado, pelo que o peso molecular da porção de PEG é preferivelmente de cerca de 2 a 180

kD, mais preferivelmente de cerca de 60 a 140 kD e, mais preferivelmente, cerca de 40 kD.

[000105] Em uma quinquaségima sexta concretização do primeiro aspecto, que é também uma concretização da quinquagésima quarta concretização do primeiro aspecto, a modificação é uma porção de HES, pelo que preferivelmente o peso molecular da porção de HES é de cerca de 10 a 130 kD, mais preferivelmente de cerca de 30 a 130 kD e, mais preferivelmente, cerca de 100 kD.

[000106] Em uma quinquagésima sétima concretização do primeiro aspecto, que é também uma concretização do primeiro aspecto e de qualquer da primeira a quinquagésima sexta concretização do primeiro aspecto, os nucleotídeos do ácido nucleico são L-nucleotídeos, preferivelmente os nucleotídeos das sequências de acordo com qualquer das SEQ ID NO: 19, 20, 21, 22, 57, 58, 90, 91, 92, e 93.

[000107] O problema básico do presente pedido é solucionado em um segundo aspecto por uma composição farmacêutica compreendendo um ácido nucleico de acordo com o primeiro aspecto e quaisquer concretizações deste, e, opcionalmente, pelo menos um constituinte adicional, pelo que o constituinte adicional é selecionado do grupo compreendendo excipientes farmaceuticamente aceitáveis e agentes farmaceuticamente ativos.

[000108] O problema básico do presente pedido é solucionado em um terceiro aspecto pelo uso de um ácido nucleico de acordo com o primeiro aspecto e quaisquer concretizações deste, para a fabricação de um medicamento.

[000109] Em uma primeira concretização do terceiro aspecto, o medicamento é usado para mobilização de célula progenitora e/ou células-tronco no sangue periférico, e/ou para o tratamento de doenças e/ou distúrbios preferivelmente selecionados do grupo compreendendo cura de ferida; queimadura; distúrbios causados por

ou associados com tecido de órgão danificado e/ou vasculatura danificada, pelo que tais distúrbios são selecionados de dano retininano e coroidal, acidente vascular cerebral, dano miocardial, infarto miocardial, isquemia após transplante de órgão e dano traumático; e distúrbios hematopoiéticos, pelo que tais distúrbios são selecionados de anemia aplástica, leucemia, anemia induzida por fármaco e leucopenia, e infecção bacteriana em leucopenia.

[000110] Em uma segunda concretização do terceiro aspecto, o medicamento é para mobilização de células de câncer no sangue periférico de um indivíduo.

[000111] Em uma terceira concretização do terceiro aspecto que é também uma concretização da segunda concretização do terceiro aspecto, as células de câncer são selecionadas de células leucêmicas, células de linfoma, células-tronco de câncer, células de câncer com potencial metastático e metástase de câncer.

[000112] Em uma quarta concretização do terceiro aspecto que é também uma concretização de qualquer da segunda à terceira concretização do terceiro aspecto, o medicamento é usado em combinação com um segundo agente farmaceuticamente ativo, pelo que o segundo agente farmaceuticamente ativo é adequado para mobilização de células de câncer no sangue periférico de um indivíduo, pelo que o segundo agente farmaceuticamente ativo é preferivelmente selecionado de agentes de mobilização de célula de câncer.

[000113] Em uma quinta concretização do terceiro aspecto que é também uma concretização de qualquer da segunda à quarta concretização do terceiro aspecto, o medicamento é usado em combinação com um terceiro agente farmaceuticamente ativo, pelo que o terceiro agente farmaceuticamente ativo danifica, destrói e/ou etiqueta as células de câncer no sangue periférico, pelo que a etiqueta

conduz a uma ativação de defesas do corpo.

[000114] Em um sexta concretização do terceiro aspecto que é também uma concretização de qualquer da segunda à quinta concretização do terceiro aspecto, o paciente está subsequentemente ou concomitantemente suportando quimioterapia e/ou radioterapia.

[000115] Em uma sétima concretização do terceiro aspecto que é também uma concretização de qualquer da quinta a sexta concretização do terceiro aspecto, o medicamento é usado para o tratamento e/ou prevenção de câncer, preferivelmente tumores sólidos e câncer hematológico, mais preferivelmente leucemia, linfoma e mieloma. Em uma oitava concretização do terceiro aspecto, o medicamento é para mobilização de células de plasma de longa vida, células B e/ou células T no sangue periférico de um indivíduo, pelo que preferivelmente as células B e/ou células T são células B de memória e/ou células T de memória.

[000116] Em uma nona concretização do terceiro aspecto que é também uma concretização da oitava concretização do terceiro aspecto, o medicamento é usado em combinação com um segundo agente farmaceuticamente ativo, pelo que o segundo agente farmaceuticamente ativo é usado para mobilização de células de plasma de longa vida, células B e/ou células T de memória no sangue periférico de um indivíduo, pelo que o segundo agente farmaceuticamente ativo é preferivelmente selecionado de gentes de mobilização de célula.

[000117] Em uma décima concretização do terceiro aspecto que é também uma concretização de qualquer da oitava a nona concretização do terceiro aspecto, o medicamento é usado em combinação com um terceiro agente farmaceuticamente ativo e o terceiro agente farmaceuticamente ativo danifica, destrói e/ou etiqueta as células de plasma de longa vida, células B e/ou células T no

sangue periférico, pelo que a etiqueta conduz a uma ativação de defesas do corpo.

[000118] Em uma décima primeira concretização do terceiro aspecto que é também uma concretização de qualquer da oitava à nona concretização do terceiro aspecto, o indivíduo está subsequentemente ou concomitantemente suportando quimioterapia e/ou radioterapia.

[000119] Em uma décima segunda concretização do terceiro aspecto que é também uma concretização de qualquer da oitava a décima primeira concretização do terceiro aspecto, o medicamento é usado para o tratamento e/ou prevenção de

[000120] doenças autoimunes sistêmicas pelo que tal doença autoimune sistêmica é preferivelmente selecionada de alergia, anemia hemolítica autoimune quente ou fria, síndrome de resposta inflamatória sistêmica, choque hemorrágico, diabetes tipo 1, escleroderma difuso, policondrite, síndrome autoimune poliglandular, lúpus eritematoso sistêmico e manifestações destas, artrite reumatoide, doença reumática no olho, cérebro, pulmão, rins, coração, fígado, trato gastrointestinal, baço, pele, ossos, sistema linfático, sangue ou outros órgãos;

[000121] doenças autoimunes do trato gastrointestinal pelo que tal doença autoimune do trato gastrointestinal é preferivelmente selecionada de doença de Crohn, colite ulcerosa, doença celíaca, intolerância à glúten, doença inflamatória do intestino, pancreatite, esofagite eosinofílica;

[000122] doenças autoimunes da pele pelo que tal doença autoimune da pele é preferivelmente selecionada de psoríase, urticária, dermatomiosite, pêndigovulgaris, pêndigofoliaceus, bullous penfigoide, escleroderma Morphea/linear, vitiligo, dermatite herpetiformis ou doença de Duhring, esclerose de líquen;

[000123] doenças autoimunes da vasculatura pelo que tal doença

autoimune da vasculatura é preferivelmente selecionada de vasculitides, preferivelmente arterite temporalis, vasculite, derrame vascular, polimialgia reumática, aterosclerose, síndrome de Churg-Strauss, arterite de Takayasu, síndrome de Goodpasture, preferivelmente afetando mais os rins, mais especificamente o glomeruli, e/ou também afetando mais os pulmões, glomerulonefrite, poliarterite nodosa, doença de Behcet;

[000124] doenças autoimunes do sistema nervoso pelo que tal doença autoimune do sistema nervoso é preferivelmente selecionada de esclerose múltipla, polineuropatia de demielinação inflamatória crônica, disfunção neurocognitiva, síndrome de stiff-man, síndrome de Guillain-Barre, miastenia gravis, síndrome de Lambert-Eaton;

[000125] doenças autoimunes do esqueleto musculares pelo que tal doença autoimune do esqueleto muscular é preferivelmente selecionada de espodilite de anquilosação, sarcoidose, polimialgia reumática, polimiosite, artrite psoriática, febre reumática, policondrite, fibromialgia, artrite reumatoide juvenil, doença de Lyme, artrite reativa, espondiloartropatia, doença de junta degenerativa;

[000126] outras doenças autoimunes pelo que tais outras doenças autoimunes são preferivelmente selecionadas de síndrome de Cogan, adrenalite autoimune, doença de Meniere, inflamações locais, alopecia areata, doenças inflamatórias agudas, cirrose biliar primária, síndrome de Sjorgen, escleroderma tais como escleroderma difuso, síndrome de CREST e/ou escleroderma Morphea/linear, uveíte autoimune, tiroidite de Hashimoto, doença Graves, hepatite autoimune, glomerulonefrite, síndrome de anti-fosfolipídeo, fibrose pulmonar idiopática, infertilidade autoimune, distúrbios complexos imunes e peritonite;

[000127] rejeição de transplante de um órgão transplantado, pelo que tal órgão é selecionado de fígado, rim, intestino, pulmão, coração, pele, membros, córnea, ilhas de Langerhans, medula óssea, vaso

sanguíneos, pâncreas;

[000128] e/ou Doença de Enxerto versus Hospedeiro após transplante de medula óssea.

[000129] Em uma décima terceira concretização do terceiro aspecto, o medicamento é para inibição de migração de leucócitos.

[000130] Em uma décima quarta concretização do terceiro aspecto que é também uma concretização da décima terceira concretização do terceiro aspecto, o medicamento é para prevenção e/ou tratamento de rejeição de transplante de órgãos transplantados, tais como fígado, rim, intestino, pulmão, coração, pele, membros, córnea, ilhas de Langerhans, medula óssea, vaso sanguíneos e pâncreas.

[000131] Em uma décima quinta concretização do terceiro aspecto que é também uma concretização da décima terceira concretização do terceiro aspecto, o medicamento é usado para o tratamento e/ou prevenção de inflamação que ocorre em ou sendo associada com doenças autoimunes sistêmicas pelo que tal doença autoimune sistêmica é preferivelmente selecionada de alergia, anemia hemolítica autoimune quente ou fria, síndrome de resposta inflamatória sistêmica, choque hemorrágico, diabetes tipo 1, escleroderma difuso, policondrite, síndrome autoimune poliglandular, lúpus eritematoso sistêmico e manifestações destas, artrite reumatoide, doença reumática no olho, cérebro, pulmão, rins, coração, fígado, trato gastrointestinal, baço, pele, ossos, sistema linfático, sangue ou outros órgãos; doenças autoimunes do trato gastrointestinal pelo que tal doença autoimune do trato gastrointestinal é preferivelmente selecionado de doença de Crohn, colite ulcerosa, doença celíaca, intolerância à glúten, doença inflamatória do intestino, pancreatite, esofagite eosinofílica; doenças autoimunes da pele pelo que tal doença autoimune da pele é preferivelmente selecionada de psoríase, urticária, dermatomiosite, pêndigovulgaris, pêndigofoliaceus, bullous

pemfigoide, escleroderma Morphea/linear, vitiligo, dermatite herpetiformis ou doença de Duhring, esclerose de líquen;

[000132] doenças autoimunes da vasculatura pelo que tal doença autoimune da vasculatura é preferivelmente selecionada de vasculitides, preferivelmente arterite temporalis, vasculite, derrame vascular, polimialgia reumática, aterosclerose, síndrome de Churg-Strauss, arterite de Takayasu, síndrome de Goodpasture, preferivelmente afetando mais os rins, afetando mais especificamente o glomeruli, e/ou também afetando mais os pulmões, glomerulonefrite, poliarterite nodosa, doença de Behcet; doenças autoimunes do sistema nervoso pelo que tal doença autoimune do sistema nervoso é preferivelmente selecionada de esclerose múltipla, polineuropatia de demielinação inflamatória crônica, disfunção neurocognitiva, síndrome de stiff-man, síndrome de Guillain-Barre, miastenia gravis, síndrome de Lambert-Eaton;

[000133] doenças autoimunes do esqueleto musculares pelo que tal doença autoimune do esqueleto muscular é preferivelmente selecionada de espodilite de anquilosação, sarcoidose, polimialgia reumática, polimiosite, artrite psoriática, febre reumática, policondrite, fibromialgia, artrite reumatoide juvenil, doença de Lyme, artrite reativa, espondiloartropatia, doença de junta degenerativa;

[000134] e/ou outras doenças autoimunes pelo que tais outras doenças autoimunes são preferivelmente selecionadas de síndrome de Cogan, adrenalite autoimune, doença de Meniere, inflamações locais, alopecia areata, doenças inflamatórias agudas, cirrose biliar primária, síndrome de Sjorgen, escleroderma tais como escleroderma difuso, síndrome de CREST e/ou escleroderma Morphea/linear, uveíte autoimune, tireoidite de Hashimoto, doença Graves, hepatite autoimune, glomerulonefrite, síndrome de anti-fosfolipídeo, fibrose pulmonar idiopática, infertilidade autoimune, distúrbios complexos

imunes e peritonite.

[000135] Em uma décima sexta concretização do terceiro aspecto que é também uma concretização da décima terceira concretização do terceiro aspecto, o medicamento é para o tratamento e/ou prevenção de reações alérgicas da pele e/ou da mucosa de vias aéreas, preferivelmente febre de feno, asma, hipersensibilidade da via aérea e/ou dermatite.

[000136] Em uma décima sétima concretização do terceiro aspecto que é também uma concretização da décima sexta concretização do terceiro aspecto, a dermatite é dermatite de contato e/ou dermatite atópica.

[000137] O problema básico do presente pedido de patente é solucionado em um quarto aspecto por um método para obtenção de células progenitoras e/ou células-tronco de um primeiro indivíduo, cujo método compreende

a) administração ao indivíduo de um ácido nucleico de acordo com o primeiro aspecto e quaisquer concretizações deste, em uma quantidade eficaz para mobilizar referidas células progenitoras e/ou células-tronco no sangue periférico de referido indivíduo;

b) seguido por coleta de referidas células progenitoras e/ou células-tronco de referido indivíduo.

[000138] Em uma primeira concretização do quarto aspecto, a coleta de células progenitoras e/ou células-tronco é feita por aférese, leucoferese, classificação de célula e/ou citometria de fluxo.

[000139] Em uma segunda concretização do quarto aspecto, que é também uma concretização do quarto aspecto e a primeira concretização do quarto aspecto, o primeiro indivíduo ou um segundo indivíduo está subsequentemente ou concomitantemente suportando quimioterapia e/ou radioterapia.

[000140] Em uma terceira concretização do quarto aspecto, que é

também uma concretização da segunda concretização do quarto aspecto, após quimioterapia e/ou radioterapia do primeiro indivíduo ou do segundo indivíduo, as células progenitoras e/ou células-tronco coletadas do primeiro indivíduo ou do segundo indivíduo são administradas no sangue periférico do primeiro indivíduo ou do segundo indivíduo.

[000141] Em uma quarta concretização do quarto aspecto, que é também uma concretização do quarto aspecto e qualquer da primeira a terceira concretização do quarto aspecto, as células progenitoras e/ou células-tronco coletadas são expandidas e as células progenitoras e/ou células-tronco expandidas administradas ao primeiro indivíduo ou ao segundo indivíduo, pelo que preferivelmente as células progenitoras e/ou células-tronco expandidas são administradas por injeção intravenosa ou injeção local.

[000142] Em uma quinta concretização do quarto aspecto, que é também uma concretização do quarto aspecto e qualquer da primeira a quarta concretização do quarto aspecto, o método é usado para o tratamento de câncer, preferivelmente tumores sólidos e malignidades hematológicas.

[000143] O problema básico do presente pedido é solucionado em um quinto aspecto pela molécula de ácido nucleico de acordo com o primeiro aspecto e quaisquer concretizações desta, para uso em um método de acordo com o quarto aspecto de quaisquer concretizações desta.

[000144] O problema básico do presente pedido é solucionado em um sexto aspecto por um método para depleção de células de plasma de longa vida, células B e/ou células T de um indivíduo, cujo método compreende

a) administração ao indivíduo de um ácido nucleico de acordo com o primeiro aspecto e quaisquer concretizações deste, em

uma quantidade eficaz para mobilizar referidas células de plasma de longa vida, células B e/ou células T no sangue periférico de referido indivíduo;

b) seguido por coleta de referidas células de plasma de longa vida, células B e/ou células T de referido indivíduo;

pelo que preferivelmente as células T exauridas e coletadas são células T de memória.

[000145] Em uma primeira concretização do sexto aspecto, a coleta das células de plasma de longa vida, células B e/ou células T é feita por aférese, classificação de célula e/ou citometria de fluxo, preferivelmente por citometria de fluxo com marcadores de superfície apropriados para referidas células.

[000146] Em um sexta concretização do quarto aspecto que é também uma concretização do quarto aspecto e qualquer da primeira a quinta concretização do quarto aspecto; e que é também uma segunda concretização do sexto aspecto que é também uma concretização do sexto aspecto e a primeira concretização do sexto aspecto, o método é usado no tratamento e/ou prevenção de doenças autoimunes sistêmicas pelo que tal doença autoimune sistêmica é preferivelmente selecionada de alergia, anemia hemolítica autoimune quente ou fria, síndrome de resposta inflamatória sistêmica, choque hemorrágico, diabetes tipo 1, escleroderma difuso, policondrite, síndrome autoimune poliglandular, lúpus eritematoso sistêmico e manifestações desta, artrite reumatoide, doença reumática no olho, cérebro, pulmão, rins, coração, fígado, trato gastrointestinal, baço, pele, ossos, sistema linfático, sangue ou outros órgãos; doenças autoimunes do trato gastrointestinal pelo que tal doença autoimune do trato gastrointestinal é preferivelmente selecionada de doença de Crohn, colite ulcerosa, doença celíaca, intolerância à glúten, doença inflamatória do intestino, pancreatite, esofagite eosinofílica; doenças

autoimunes da pele pelo que tal doença autoimune da pele é preferivelmente selecionada de psoríase, urticária, dermatomiosite, pêndigovulgaris, pêndigofoliaceus, bullous pemfigoide, escleroderma Morphea/linear, vitiligo, dermatite herpetiformis ou doença de Duhring, esclerose de líquen;

[000147] doenças autoimunes da vasculatura pelo que tal doença autoimune da vasculatura é preferivelmente selecionada de vasculitides, preferivelmente arterite temporalis, vasculite, derrame vascular, polimialgia reumática, aterosclerose, síndrome de Churg-Strauss, arterite de Takayasu, síndrome de Goodpasture, preferivelmente afetando mais os rins, mais especificamente o glomeruli, e/ou também afetando mais os pulmões, glomerulonefrite, poliarterite nodosa, doença de Behcet; doenças autoimunes do sistema nervoso pelo que tal doença autoimune do sistema nervoso é preferivelmente selecionada de esclerose múltipla, polineuropatia de desmielinação inflamatória crônica, disfunção neurocognitiva, síndrome de stiff-man, síndrome de Guillain-Barre, miastenia gravis, síndrome de Lambert-Eaton;

[000148] doenças autoimunes do esqueleto musculares pelo que tal doença autoimune do esqueleto muscular é preferivelmente selecionada de espodilite de anquilosação, sarcoidose, polimialgia reumática, polimiosite, artrite psoriática, febre reumática, policondrite, fibromialgia, artrite reumatoide juvenil, doença de Lyme, artrite reativa, espondiloartropatia, doença de junta degenerativa;

[000149] outras doenças autoimunes pelo que tais outras doenças autoimunes são preferivelmente selecionadas de síndrome de Cogan, adrenalite autoimune, doença de Meniere, inflamações locais, alopecia areata, doenças inflamatórias agudas, cirrose biliar primária, síndrome de Sjorgen, escleroderma tais como escleroderma difuso, síndrome de CREST e/ou escleroderma Morphea/linear, uveíte autoimune, tiroidite

de Hashimoto, doença Graves, hepatite autoimune, glomerulonefrite, síndrome de anti-fosfolipídeo, fibrose pulmonar idiopática, infertilidade autoimune, distúrbios complexos imunes e peritonite;

[000150] rejeição de transplante de um órgão transplantado pelo que tal órgão é selecionado de fígado, rim, intestino, pulmão, coração, pele, membros, córnea, ilhas de Langerhans, medula óssea, vaso sanguíneos, pâncreas;

e/ou Doença de Enxerto versus Hospedeiro após transplante de medula óssea.

[000151] O problema básico do presente pedido é solucionado em um sétimo aspecto pela molécula de ácido nucleico de acordo com o primeiro aspecto e quaisquer concretizações desta, para uso em um método de acordo com o sexto aspecto e qualquer concretização deste.

[000152] O problema básico do presente pedido é solucionado em um oitavo aspecto pelo uso de um ácido nucleico conforme definido na reivindicação de qualquer das 10 a 57 concretizações do primeiro aspecto para a fabricação de um medicamento, pelo que o medicamento é para o tratamento e/ou prevenção de nefropatia, preferivelmente nefropatia diabética.

[000153] O problema básico do presente pedido é solucionado em um nono aspecto pelo uso de um ácido nucleico conforme definido na reivindicação de qualquer das décimas a quinquagésima sétima concretização do primeiro aspecto para a fabricação de um medicamento, pelo que o medicamento é para o tratamento e/ou prevenção de hipertensão, preferivelmente hipertensão pulmonar.

[000154] O problema básico do presente pedido é solucionado em um décimo aspecto pelo uso de um ácido nucleico conforme definido na reivindicação de qualquer da décima a quinquagésima sétima concretização do primeiro aspecto para a fabricação de um

medicamento, pelo que o medicamento é para o tratamento e/ou prevenção de fibrose, preferivelmente fibrose pulmonar idiopática.

[000155] Em uma primeira concretização do décimo aspecto, o medicamento é para o tratamento e/ou prevenção de fibrose dentro do processo de cura de ferida.

[000156] O problema básico do presente pedido é solucionado em um décimo primeiro aspecto pelo uso de um ácido nucleico conforme definido na reivindicação de qualquer da décima e quinquagésima sétima concretização para a fabricação de um medicamento, pelo que o medicamento é para o tratamento de uma doença e/ou distúrbio que envolve angiogênese e/ou neovascularização.

[000157] Em uma primeira concretização do décimo primeiro aspecto, o medicamento é usado para terapia de combinação com um agente de inibição de VEGF.

[000158] Em uma segunda concretização do décimo primeiro aspecto que é também uma concretização da primeira concretização do décimo segundo aspecto, o medicamento é usado em indivíduos que respondem fracamente à terapia com um agente de inibição de VEGF.

[000159] Em uma terceira concretização do décimo primeiro aspecto, o medicamento é usado em indivíduos que não respondem à terapia com um agente de inibição de VEGF.

[000160] Em uma quarta concretização do décimo primeiro aspecto, a doença e/ou distúrbio envolve e/ou está associada com neovascularização coroidal.

[000161] Em uma quinta concretização do décimo primeiro aspecto que é também uma concretização do décimo primeiro aspecto e de qualquer da primeira a quarta concretização do décimo primeiro aspecto, a doença e/ou distúrbio é selecionada do grupo compreendendo doenças retinianas, preferivelmente degeneração

macular relacionada à idade, retinopatia diabética, oclusão de veia retiniana, edema macular e edema retiniana.

[000162] Em uma sexta concretização do décimo primeiro aspecto que é também uma concretização do décimo primeiro aspecto e de qualquer da primeira a terceira concretização do décimo primeiro aspecto, a doença é selecionada do grupo compreendendo câncer, preferivelmente tumores sólidos e metástase.

[000163] Em uma décima oitava concretização do terceiro aspecto, o medicamento é para ser administrado a um indivíduo que é ou está suportando um regime de tratamento que exaure células progenitoras e/ou células-tronco no indivíduo, preferivelmente depleção no sangue periférico.

[000164] Em uma décima nona concretização do terceiro aspecto que é também uma concretização do terceiro aspecto e da décima oitava concretização do terceiro aspecto, o medicamento é para ser administrado a um indivíduo que está ou é para estar suportando quimioterapia e/ou radioterapia.

[000165] Em uma vigésima concretização do terceiro aspecto, o medicamento é para restauração ou aperfeiçoamento de um sistema imune em um indivíduo.

[000166] O problema básico do presente pedido é solucionado em um décimo segundo aspecto por uma molécula que inibe a sinalização entre SDF-1 e receptor de SDF-1 para a fabricação de um medicamento, pelo que o medicamento é para o tratamento e/ou prevenção de nefropatia, preferivelmente nefropatia diabética.

[000167] Em uma primeira concretização do décimo segundo aspecto, a molécula é uma Molécula de ligação de SDF-1 ou uma molécula de ligação de receptor de SDF-1 e compreende ácidos nucleicos de ligação alvos similares a aptâmeros e Spiegelmers, anticorpos e moléculas pequenas.

[000168] Em uma segunda concretização do décimo segundo aspecto que é também uma concretização do décimo segundo aspecto e da primeira concretização do décimo segundo aspecto, a molécula é uma molécula de ácido nucleico conforme definida na décima à quinquagésima concretização do primeiro aspecto.

[000169] Em uma terceira concretização do décimo segundo aspecto, a molécula é uma molécula que inibe a expressão de SDF-1 ou o receptor de **SDF**-1, e compreende moléculas de siRNA, ribozimas, moléculas de antissenso e inibidores de fatores de transcrição.

[000170] O problema básico do presente pedido é solucionado em um décimo terceiro aspecto por uma molécula de ácido nucleico de acordo com qualquer das quinta a quinquagésima sétima concretização do primeiro aspecto para uso em um método para inibição de migração de leucócitos.

[000171] O problema básico do presente pedido é solucionado em um décimo quarto aspecto por uma Molécula de ligação de SDF-1 que não atravessa a barreira sangue-cérebro para uso na mobilização de células-tronco derivadas da medula óssea ou para uso na fabricação de um medicamento, preferivelmente um medicamento para a mobilização de células-tronco derivadas de medula óssea.

[000172] Em uma primeira concretização do décimo quarto aspecto, o medicamento é usado para a melhora de um dano do sistema nervoso central e/ou para a promoção de reparo no tecido após acidente vascular cerebral, preferivelmente acidente vascular cerebral isquêmico.

[000173] Em uma segunda concretização do décimo quarto aspecto que é também uma concretização da primeira concretização do décimo quarto aspecto, a Molécula de ligação de SDF-1 compreende ácidos nucleicos de ligação-alvo selecionados do grupo

compreendendo aptâmeros, Spiegelmers, anticorpos e moléculas pequenas.

[000174] Em uma terceira concretização do décimo quarto aspecto que é também uma concretização do décimo quarto aspecto e de qualquer da primeira à segunda concretização do décimo quarto aspecto, a molécula é uma molécula de ácido nucleico conforme definido em qualquer da nona à quinquagésima sétima concretizações do primeiro aspecto.

[000175] O problema básico do presente pedido é solucionado em um décimo quinto aspecto por uma molécula de ácido nucleico de acordo com o primeiro aspecto e qualquer um da primeira a quinquagésima sétima concretização do primeiro aspecto para uso no tratamento de uma doença conforme definido em qualquer das reivindicações precedentes.

[000176] O problema básico do presente pedido é solucionado em um décimo sexto aspecto pelo uso de um ácido nucleico conforme definido na décima a quinquagésima sétima concretização do primeiro aspecto para a fabricação de um medicamento, pelo que o medicamento é para o tratamento e/ou prevenção da síndrome de WHIM.

[000177] O problema básico do presente pedido é solucionado em um décimo sétimo aspecto pelo uso de um ácido nucleico conforme definido na décima à quinquagésima sétima concretização do primeiro aspecto para a fabricação de um medicamento, pelo que o medicamento é para o tratamento e/ou prevenção de crescimento e metástase de câncer, e crescimento de neoplasia.

[000178] O problema básico do presente pedido é solucionado em um décimo oitavo aspecto pelo uso de um ácido nucleico conforme definido na décima à quinquagésima sétima concretização do primeiro aspecto para a fabricação de um medicamento, pelo que o

medicamento é administrado a um indivíduo antes da quimioterapia, preferivelmente quimioterapia administrada para o tratamento de câncer.

[000179] Enquanto não se deseja estar ligado por qualquer teoria, os presentes inventores assumiram que as moléculas de ácido nucleico de acordo com a presente invenção inibem a ligação de SDF-1 a seu receptor de SDF-1 e, desse modo, ou diretamente ou indiretamente, influenciam a migração de células, preferivelmente migração de células do sangue periférico em um tecido ou mais tecido(s), e de tecidos no sangue periférico.

[000180] Contudo, enquanto não se deseja estar ligado por qualquer teoria, os presentes inventores assumiram adicionalmente que as moléculas de ácido nucleico de acordo com a presente invenção que inibem a ligação de SDF-1 ao receptor de SDF-1 conduzem a migração de células progenitoras, células-tronco, células de câncer, células de plasma de longa vida, células B e/ou células T, preferivelmente por mobilização, de tecidos no sangue periférico, em virtude da inibição da interação entre SDF-1 e o receptor de SDF-1.

[000181] Adicionalmente e novamente sem desejar estar ligado por qualquer teoria, os presentes inventores assumiram que as moléculas de ácido nucleico de acordo com a presente invenção que inibem a ligação de SDF-1 a seus receptores de SDF-1 evitam a migração de leucócitos tais como T-linfócitos, B-linfócitos, monócitos, macrófagos, eosinófilos, neutrófilos, basófilos e/ou células de mastro e dendríticas, preferivelmente em tecidos similares à pele ou mucosa, e, preferivelmente, ajudam a atenuar doenças autoimunes e reações alérgicas de pele e mucosa.

[000182] Em adição e ainda sem desejar estar ligado por qualquer teoria, os presentes inventores foram capazes de demonstrar que o uso de agentes de inibição de SDF-1 similares as moléculas de ácido

nucleico de acordo com a presente invenção pode ser usado no tratamento de nefropatia, preferivelmente nefropatia diabética; hipertensão, preferivelmente hipertensão pulmonar; fibrose, preferivelmente fibrose pulmonar, e no tratamento de doenças e/ou distúrbios que envolvem neovascularização, preferivelmente neovascularização coroidal.

[000183] Como para as várias doenças, condições e distúrbios que podem ser tratados ou prevenidos pelo uso das moléculas de ácido nucleico de acordo com a presente invenção ou composições, preferivelmente composições farmacêuticas compreendendo as mesmas, é para ser compreendido que tais doenças, condições e distúrbios são aqueles que são aqui descritos, incluindo e em particular aqueles descritos e colocados na parte introdutória do presente pedido. À medida que as respectivas passagens formam uma parte integral da presente descrição que ensina a adequabilidade das moléculas de ácido nucleico para a prevenção e tratamento, respectivamente, para referidas doenças, condições, e distúrbios.

[000184] Após administração intravenosa de uma Molécula de ligação de SDF-1 de ácido nucleico tal como NOX-A12-JE40, as células estão no sangue, pelo que o efeito do ácido nucleico de ligação de SDF-1 NOX-A12-JE40 foi visto após realização de uma contagem de célula de sangue total usando um hemocitômetro (vide Exemplo 10). Enquanto que células-tronco hematopoiéticas / células progenitoras hematopoiéticas somente representam uma fração pequena das células de sangue brancas mobilizadas, existem outros tipos de células que foram liberadas no sangue. Entre estas estão monócitos e neutrófilo granulócitos, bem como tronco comprometido por tecido/células progenitoras, células-tronco mesenquimais, células de plasma B de longa vida, em limitação a estas células.

[000185] Baseados nestes resultados, os inventores concluíram que

a inibição da sinalização de SDF-1 para receptor de SDF-1 por uma Molécula de ligação de SDF-1 de ácido nucleico de acordo com a presente invenção conduz a influência de migração de células. Preferivelmente, as células expressam um receptor de SDF-1.

[000186] Consequentemente, o termo migração conforme preferivelmente usado aqui refere-se a migração e/ou movimento de um tecido em outro tecido, de um tecido no sangue periférico e/ou do sangue periférico em um tecido. A migração de células pode ser testada em um ensaio-TAX (migração in vitro), conforme mostrado no Exemplo 5 e/ou usando-se um hemocitômetro e análise de FACS conforme mostrado no Exemplo 10 (experimento in vivo). Adicionalmente, a imuno-histoquímica de tecido pode ser feita, pelo que as células migradas são detectadas por anticorpos direcionados a marcadores específicos de célula de superfície. Conforme aqui usado, o termo receptor de SDF-1, indiferente se usado no plural ou singular, refere-se a qualquer receptor que se liga a SDF-1. Hoje existem dois receptores conhecidos, o CXCR 4 (Godessart 2005) e o CXCR7 (Burns, Summers, e outros. 2006) que são receptores de ligação de SDF-1 preferidos.

Desenvolvimento de célula de sangue.

[000187] O desenvolvimento e mutação de células de sangue é um processo complexo. As células de sangue maturas são derivadas de células precursoras hematopoiéticas, também referidas como células progenitoras, e células-tronco presentes nos tecidos hematopoiéticos específicos incluindo medula óssea. Dentro destes ambientes, as células hematopoiéticas proliferam-se e diferenciam-se antes de entrarem na circulação. O receptor de quimiocina CXCR4 e seu ligante natural SDF-1 parece ser importante neste processo (Maekawa e Ishii 2000; Nagasawa 2000). Isto tem sido demonstrado por relatórios que eliminação de CXCR4 ou SDF-1 de camundongos exibem defeitos

hematopoiéticos (Ma, Jones e outros. 1998; Tachibana, Hirota e outros. 1998; Zou, Kottmann e outros. 1998). É também conhecido que células progenitoras CD34+ expressam CXCR4 e requerem SDF-1 produzida por células estromais de medula óssea para quimioatração e enxertamento (Peled, Petit e outros. 1999) e que *in vitro,* SDF-1 é quimiotática para ambas células CD34+ (Aiuti, Webb e outros. 1997; Viardot, Kronenwert e outros. 1998) e para células progenitoras/ troncos (Jo, Rafii e outros. 2000). SDF-1 é também um quimioatraente importante, sinalizando via o receptor de CXCR4, para vários outros mais progenitores comprometidos e células de sangue maturas incluindo T-linfócitos e monócitos (Bleul, Fuhlbrigge e outros. 1996), pró-e pré-B linfócitos (Fedyk, Ryyan e outros. 1999) e megacariócitos (Riviere, Subra e outros. 1999; Abi-Younes, Sauty e outros. 2000; Hodohara, Fujii e outros. 2000; Majka, Janowska-Wieczorek e outros. 2000; Gear, Suttitanamongkol e outros. 2001). Devido a este relacionamento entre os vários tipos de célula e o envolvimento de SDF-1 e o receptor de SDF-1, os vários tipos de célula podem ser atualmente determinados pelas moléculas de ácido nucleico de acordo com a presente invenção.

[000188] Desse modo, em resumo, parece que SDF-1 é capaz de controlar o posicionamento e diferenciação de células suportando receptor de SDF-1s, preferivelmente receptores de CXCR4 se estas células são células-tronco, isto é, células que são CD34+, e/ou células progenitoras que resultam na formação de tipos especificados de colônias em resposta ao estímulo particular; que pode ser CD34+ ou CD34-, ou células que são um tanto mais diferenciadas.

[000189] Recentemente, atenção considerável tem sido focalizada no número de células CD34+ mobilizadas na reunião de células progenitoras de sangue periférico usado para transplante de célula de mastro autóloga e de aloenxerto. A população de CD34+ é o

componente a ser principalmente responsável pelo tempo de recuperação aperfeiçoado após quimioterapia e as células mais provavelmente responsáveis pelo enxertamento de longo prazo e restauração de hematopoiese (Croop, Cooper e outros. 2000). O mecanismo pelo qual as células CD34+ re-enxertam pode ser devido aos efeitos quimiotáticos de SDF-1 nas células de expressão de CXCR4 (Ponomaryov, Peled e outros. 2000; Voermans, Kooi e outros. 2001). Mais recentemente, células-tronco hematopoiéticas adultas foram mostradas serem capazes de restaurar tecido cardíaco danificado em camundongos (Jackson, Majka e outros. 2001; Kocher, Schuster e outros. 2001).

[000190] Conforme preferivelmente usado aqui, o termo células progenitoras refere-se a células que, em resposta a certo estímulo, podem formar células diferenciadas hematopoiéticas ou mieloides. A presença de células progenitoras pode ser avaliada pela capacidade das células formarem unidades de formação de colônia de vários tipos, incluindo, por exemplo, CFU-GM (que significa unidades de formação de colônia granulócito-macrófago); CFU-GEMM (que significa unidades de formação de colônia, multipotenciais); BFU-E (unidades de formação de ruptura, eritroides); HPP-CFC (que significa células de formação de colônia de potencial proliferativo alto); ou outros tipos de colônias diferenciadas que podem ser obtidas na cultura usando protocolos conhecidos.

[000191] Conforme preferivelmente usado aqui, células-tronco são formas menos diferenciadas de células progenitoras. Tipicamente, tais células são frequentemente positivas para CD34. Algumas células-tronco não contêm este marcador, contudo. As células CD34+ podem ser ensaiadas usando-se classificação de célula ativada de fluorescência (abrev. FACS) e, desse modo, sua presença pode ser avaliada em uma amostra usando-se esta técnica.

[000192] Em geral, células CD34+ estão presentes somente em níveis baixos no sangue, mas estão presentes em grandes números em medula óssea. Enquanto outros tipos de células tais como células endoteliais e células de mastro também podem exibir este marcador, CD34 é considerado um índice de presença de célula de mastro.

[000193] Sem desejar estar ligado por qualquer teoria, os inventores verificaram que em adição às células-tronco e/ou células progenitoras, células de câncer, células de plasma de longa vida, células B e/ou células T são afetadas pelo efeito inibitório do ácido nucleico de acordo com a presente invenção na sinalização entre SDF-1 e seu receptor de SDF-1. As células B e células T são preferivelmente células B de memória e células T de memória. A inibição da sinalização entre SDF-1 e o receptor de SDF-1 conduz a uma migração, compreendendo mobilização, no sangue periférico.

[000194] A mobilização das células-tronco, células progenitoras, células de câncer, células de plasma de longa vida, células B e/ou células T preferivelmente ocorre em tecidos hematopoiéticos, pelo que o tecido hematopoiético é selecionado do grupo consistindo em tecido mieloide e tecido linfoide. O tecido mieloide está localizado no medula óssea. O tecido linfoide está localizado na mucosa do trato digestivo e trato respiratório, nodos de linfa, no baço e/ou no timo.

[000195] Conforme preferivelmente usado aqui, as células de câncer são células neoplásticas e são preferivelmente selecionadas de células leucêmicas, células de mieloma, células de linfoma, células-tronco de câncer, células de câncer com potencial metastático e metástase de câncer. As células neoplásticas tipicamente suportam anormalidades comuns genéticas ou epigenéticas, uma evidência de clonalidade. Para alguns tipos de neoplasma, por exemplo linfoma e leucemia, a demonstração de clonalidade é agora considerada ser necessária (embora não suficiente) para definir uma proliferação

celular como neoplástica.

[000196] Após uma resposta imune aguda com produção de anticorpo ativa por células B terminalmente diferenciadas (células de plasma), a maioria destas células morre com a resolução da doença, e/ou a eliminação do antígeno estranho (por exemplo, proteína de vírus). Existe, contudo, uma minoridade de células B de memória que pode ser girada nos plasmablastos com a ajuda de uma célula T. Estes plasmablastos têm a capacidade de migrar em resposta a estímulo quimiotático nos nichos onde eles sobrevivem como células de plasma de "memória" de vida longa por anos. Estes nichos podem estar ambos no medula óssea e na periferia, por exemplo, em tecidos inflamados. Estas células de plasma de longa vida são mais provavelmente responsáveis pela manutenção das titulações de plasma de anticorpo protetor que são frequentemente mantidas por anos após uma infecção ou uma vacinação (Tarlinton e outros, 2008).

[000197] A mobilização das células progenitoras e/ou das células-tronco preferivelmente ocorre de tecidos hematopoiéticos, pelo que o tecido hematopoiético é selecionado do grupo de tecido mieloide e tecido linfoide. O tecido mieloide está localizado no medula óssea. O tecido linfoide está localizado na mucosa do trato digestivo e trato respiratório, nodos de linfa, do baço, do timo e folículos linfoides em um tecido inflamado. Preferivelmente, a mobilização das células conforme revelado antes compreende migração das células conforme revelado antes no sangue periférico.

[000198] Conforme mostrado antes, SDF-1 foi verificado agir como um agente quimiotático nas células de mastro maturas e precursoras – especialmente quando histamina é liberada das células de mastro maturas, por exemplo, por sinalização de IgE através da ligação ao receptor Fc-epsilon na superfície da célula-tronco (Godot, Arock e outros. 2007). Doenças similares a reações alérgicas da pele e

mucosa de vias aéreas, tais como febre de feno e asma, dermatite, especialmente dermatite de contato e dermatite atópica, frequentemente envolvem uma migração de leucócito e acúmulo nos tecidos afetados. Expressão de SDF-1 foi também observada em biópsias sinoviais e por RT-PCR de indivíduos afetados por inflamação de junta como espondiloartropatia, artrite reumatoide, artrite psoriátrica e doença de junta degenerativa (osteoartrite). A interferência com SDF-1 por ácidos nucleicos de ligação de SDF-1 de acordo com a presente invenção pode, portanto, ter efeitos positivos para pacientes que sofrem de inflamação de junta.

[000199] Por estes meios e em vista do envolvimento esboçado de SDF-1 e receptores de SDF-1, a ligação de SDF-1 e a interação entre SDF-1 e moléculas de ácido nucleico de inibição de receptor de SDF-1 de acordo com a presente invenção pode ajudar a atenuar tais doenças, pelo que inibição de SDF-1 pelas moléculas de ácido nucleicos de acordo com a presente invenção conduz a redução e/ou inibição de migração de leucócitos pelo que leucócitos são preferivelmente selecionados do grupo T-linfócitos, B-linfócitos, monócitos, macrófagos, megacariócitos, eosinófilos, neutrófilos, basófilos, células dendríticas e/ou células-tronco.

[000200] A migração de leucócitos conduz a um acúmulo em um tecido, pelo que preferivelmente o acúmulo dos leucócitos conduz a uma inflamação do referido tecido, pelo que o tecido compreende pele e/ou mucosa, preferivelmente mucosa de vias aéreas, e vários órgãos conforme selecionados de, mas não restritos a, olho, cérebro, pulmão, rins, coração, fígado, trato gastrointestinal, baço, pele, ossos e/ou o sistema linfático.

[000201] Um antagonista para SDF-1 é uma molécula que se liga a SDF-1 e inibe a função de SDF-1, preferivelmente em ensaio baseado em célula ou em um modelo in vivo conforme descrito nos Exemplos.

[000202] Além disso, a presente invenção é baseada na surpreendente descoberta que é possível gerar ácidos nucleicos que se ligam especificamente e com alta afinidade a SDF-1. Tais ácidos nucleicos são preferivelmente também referidos aqui como as moléculas de ácido nucleico de acordo com a presente invenção, os ácidos nucleicos de acordo com a presente invenção, os ácidos nucleicos da invenção, ou as moléculas de ácido nucleico da invenção.

[000203] SDF-1 é um peptídeo básico tendo a sequência de aminoácido de acordo com SEQ. ID. No. 1. O pI calculado de SDF-1 é 9,70. Conforme aqui usado, o termo SDF-1 refere-se a qualquer SDF-1 incluindo, mas não-limitado a, SDF-1 de mamífero. Preferivelmente, a SDF-1 de mamífero é selecionada do grupo compreendendo SDF-1 de camundongos, rato, coelho, hamster, macaco e ser humano. Mais preferivelmente, a SDF-1 é SDF-1 humana também referida como SDF-1α (SEQ.ID. No. 1) e/ ou SDF-1 β humana (SEQ ID No. 2), mais preferivelmente SDF-1 humana também referida como SDF-1 α (SEQ.ID. No. 1)

[000204] A descoberta que ácidos nucleicos de ligação de alta afinidade a SDF-1 podem ser identificados, é surpreendente a medida que Eaton e outros. (Eaton, Gold et ai. 1997) observaram que a geração de aptâmeros, isto é, ligação de D-ácidos nucleicos a uma molécula-alvo, direcionada a uma proteína básica é em geral muito difícil porque este tipo de alvo produz uma proporção de sinal para ruído alta, mas não específica. Esta alta proporção de sinal para ruído resulta da afinidade alta não-específica mostrada pelos ácidos nucleicos para alvos básicos tal como SDF-1.

[000205] As características do ácido nucleico de acordo com a presente invenção conforme descrito aqui podem ser compreendidas em qualquer aspecto da presente invenção onde o ácido nucleico é usado, ou sozinho ou em qualquer combinação.

[000206] Sem desejar estar ligado por qualquer teoria, os presentes inventores assumiram que a especificidade observada dos ácidos nucleicos de ligação de SDF-1 de acordo com a presente invenção compartilha algumas características estruturais e, em particular, uma das sequências de nucleotídeos que são também referidas aqui como sequências de núcleo que devem ser discutidas em maiores detalhes em seguida, pelo que referência é feita às Figuras 1 a 8 e ao Exemplo 1. Contudo, é para ser compreendido que referidas Figs e o Exemplo 1 incorporam várias de referidas características estruturais que não têm que ser necessariamente compreendidas em cada e qualquer dos ácidos nucleicos de acordo com a presente invenção.

[000207] Conforme esboçado em maiores detalhes nas reivindicações e exemplo 1, as várias Moléculas de ligação de SDF-1 humanas de ácidos nucleicos podem ser categorizadas baseadas nas referidas Caixas e algumas características estruturais e elementos, respectivamente. As várias categorias assim definidas são também referidas aqui como tipos e, mais especificamente, como Tipo A, Tipo B e Tipo C.

[000208] Em uma concretização preferida, o ácido nucleico de acordo com a presente invenção é uma molécula de ácido nucleico simples. Em uma concretização adicional, uma molécula de ácido nucleico simples está presente como uma multiplicidade da molécula de ácido nucleico simples. Preferivelmente, os termos ácido nucleico e molécula de ácido nucleico são usados em uma maneira permutável aqui se não indicado ao contrário.

[000209] Será compreendido por aqueles versados na técnica que a molécula de ácido nucleico de acordo com a invenção preferivelmente consiste em nucleotídeos que são covalentemente ligados um ao outro, preferivelmente através de ligações de fosfodiéster ou ligações.

[000210] Os ácidos nucleicos de acordo com a presente invenção

devem também compreender ácidos nucleicos que são essencialmente homólogos às sequências particulares aqui descritas. O termo substancialmente homólogo deve ser compreendido tal como a homologia é pelo menos 75%, preferivelmente 85%, mais preferivelmente 90% e, mais preferivelmente, mais que 95%, 96%, 97%, 98% ou 99%.

[000211] A percentagem atual de nucleotídeos homólogos presente no ácido nucleico de acordo com a presente invenção dependerá do número total de nucleotídeos presentes no ácido nucleico. A percentagem de modificação pode ser baseada no número total de nucleotídeos presentes no ácido nucleico.

[000212] A homologia pode ser determinada conforme conhecido ao versado na técnica. Mais especificamente, um algoritmo de comparação de sequência em seguida calcula a percentagem de identidade de sequência para a(s) sequência(s) de teste(s) relativa(s) a sequência de referência, baseado nos parâmetros de programa designados. A sequência de teste é preferivelmente a sequência ou molécula de ácido nucleico que é referido para ser ou para ser testada se ela é homóloga, e se assim, para qual extensão, para outra molécula de ácido nucleico, pelo que tal outra molécula de ácido nucleico é também referida como a sequência de referência. Em uma concretização, a sequência de referência é uma molécula de ácido nucleico conforme descrito aqui, mais preferivelmente uma molécula de ácido nucleico tendo uma sequência de acordo com qualquer das SEQ. ID. NOs. 5 a 144. O alinhamento ótimo de sequências para comparação pode ser conduzido, por exemplo, pelo algoritmo de homologia local de Smith & Waterman (Smith & Waterman, 1981) pelo algoritmo de alinhamento de homologia de Needleman & Wunsch (Needleman & Wunsch, 1970) pela pesquisa de método de similaridade de Pearson & Lipman (Pearson & Lipman, 1988), por

implementações computadorizadas destes algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, e TFASTA na Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Grupo, 575 Science Dr., Madison, Wis.), ou por inspeção visual.

[000213] Um exemplo de tal algoritmo que é adequado para determinação de percentagem de identidade de sequência é o algoritmo usado na ferramenta de pesquisa de alinhamento local básico (daqui por diante "BLAST"), vide, por exemplo Altschul e outros (Altschul e outros. 1990 e Altschul e outros, 1997). O software para realização de análise de BLAST é publicamente disponível através do National Center for Biotechnology Information (daqui por diante "NCBI"). Os parâmetros de falta usados na determinação da identidade de sequência usando o software disponível de NCBI, por exemplo, BLASTN (para sequências de nucleotídeo) e BLASTP (para sequências de aminoácido) são descritos em McGinnis e outros (McGinnis e outros, 2004).

[000214] O termo ácido nucleico da invenção ou ácido nucleico de acordo com a presente invenção deve também compreender aqueles ácidos nucleicos compreendendo as sequências de ácido nucleico aqui descritas ou parte desta, preferivelmente para a extensão que os ácidos nucleicos ou referidas partes são envolvidas na ligação a SDF-1. Tal ácido nucleico pode ser derivado dos ácidos nucleicos aqui descritos, por exemplo, por truncamento. O truncamento pode estar relacionado a ou a ambas das extremidades dos ácidos nucleicos conforme aqui descrito. Também, o truncamento pode estar relacionado à sequência interna de nucleotídeos, isto é, ela pode estar relacionada ao(s) nucleotídeo(s) entre o nucleotídeo terminal 5' e 3', respectivamente. Além disso, o truncamento deve compreender a anulação de pouco nucleotídeo simples a partir da sequência dos ácidos nucleicos aqui descrita. O truncamento pode também estar

relacionado a mais do que uma extensão do(s) ácido nucleico(s) da invenção, pelo que a extensão pode ser um nucleotídeo pouco longo. A ligação de um ácido nucleico de acordo com a presente invenção pode ser determinada pelos versados na técnica usando experimentos de rotina ou pelo uso ou adotando um método conforme descrito aqui, preferivelmente conforme descrito aqui na parte de exemplo.

[000215] Os ácido nucleicos de acordo com a presente invenção podem ser ou D-ácidos nucleicos ou L-ácidos nucleicos. Preferivelmente, os ácidos nucleicos da invenção são L-ácidos nucleicos. Em adição, é possível que uma ou várias partes do ácido nucleico estão presentes como D-ácidos nucleicos ou pelo menos uma ou mais várias partes dos ácidos nucleicos são L-ácidos nucleicos. O termo "parte" dos ácidos nucleicos deve significar pouco nucleotídeo. Tais ácidos nucleicos são geralmente referidos aqui como D- e L-ácidos nucleicos, respectivamente. Portanto, em uma concretização particularmente preferida, os ácidos nucleicos de acordo com a presente invenção consistem em L-nucleotídeos e compreendem pelo menos um D-nucleotídeo. Tal D-nucleotídeo é preferivelmente fixado a uma parte diferente a partir das extensões que definem os ácidos nucleicos de acordo com a presente invenção, preferivelmente aquelas partes destes, onde uma interação com outras partes do ácido nucleico é envolvida. Preferivelmente, qual D-nucleotídeo é fixado em um terminal de qualquer das extensões e de qualquer ácido nucleico de acordo com a presente invenção, respectivamente. Em uma concretização adicional preferida, tais D-nucleotídeos podem agir como um espaçador ou um ligante, preferivelmente fixando modificações tais como PEG e HES aos ácidos nucleicos de acordo com a presente invenção.

[000216] Está também dentro da tentativa da presente invenção que cada e qualquer das moléculas de ácido nucleico aqui descritas em

sua totalidade em termos de sua sequência(s) de ácido nucleico são limitadas a sequência(s) de nucleotídeo. Em outras palavras, os termos "compreendendo" ou "compreende(m)" devem ser interpretados em tal concretização no significado de contendo ou consistindo em.

[000217] Está também dentro da presente invenção que os ácidos nucleicos de acordo com a presente invenção são parte de um ácido nucleico mais longo pelo que este ácido nucleico mais longo compreende várias partes pelo que pelo menos uma tal parte é um ácido nucleico, ou uma parte deste, de acordo com a presente invenção. A(s) outra(s) parte(s) destes ácidos nucleicos mais longo podem ser ou um ou vários D-ácido nucleico(s) ou L-ácido nucleico(s). Qualquer combinação pode ser usada em conjunto com a presente invenção. Esta(s) outra(s) parte(s) do ácido nucleico mais longo pode(m) exibir uma função que é diferente de ligação, preferivelmente de ligação a SDF-1. Uma função possível é permitir interação com outras moléculas, pelo que tais outras moléculas preferivelmente são diferentes de SDF-1, tal como, por exemplo, por imobilização, reticulação, detecção ou amplificação. Em uma concretização adicional da presente invenção, os ácidos nucleicos de acordo com a invenção compreendem, como porções individuais ou combinadas, vários dos ácidos nucleicos da presente invenção. Tal ácido nucleico compreendendo vários dos ácidos nucleicos da presente invenção é também envolvido pelo termo ácido nucleico mais longo.

[000218] L-ácidos nucleicos conforme aqui usado são ácidos nucleicos consistindo em L-nucleotídeos, preferivelmente consistindo completamente de L-nucleotídeos. D-ácidos nucleicos conforme aqui usados são ácidos nucleicos consistindo em D-nucleotídeos, preferivelmente consistindo completamente de D-nucleotídeos.

[000219] Os termos ácido nucleico e molécula de ácido nucleico são

usados aqui em um maneira permutável se não explicitamente indicado ao contrário.

[000220] Também, se não indicado ao contrário, qualquer sequência de nucleotídeo é colocada aqui na direção 5' -> 3'.

[000221] Indiferente se o ácido nucleico da invenção consiste em D-nucleotídeos, L-nucleotídeos ou uma combinação de ambos com a combinação sendo, por exemplo, uma combinação aleatória, ou uma sequência definida de extensões consistindo em pelo menos um L-nucleotídeo e pelo menos um D-ácido nucleico, o ácido nucleico pode consistir de desoxirribonucleotídeo(s), ribonucleotídeo(s) ou combinações destes.

[000222] A designação dos ácidos nucleicos da invenção como L-ácido nucleico é vantajosa por várias razões. L-ácidos nucleicos são enantiômeros de ácidos nucleicos que ocorrem naturalmente. D-ácidos nucleicos, contudo, não são muito estáveis em soluções aquosas e particularmente em sistemas biológicos ou amostras biológicas devido a presença difundida de nucleases. Nucleases que ocorrem naturalmente, particularmente nucleases de células animais não são capazes de degradar L-ácidos nucleicos. Devido a esta meia vida biológica do L-ácido nucleico ser significantemente aumentada em tal sistema, incluindo o animal e corpo humano. Devido a carência de degradabilidade de L-ácido nucleico, nenhum produto de degradação de nuclease é gerado e, desse modo, nenhum efeito colateral ocorre a partir deste observado. Este aspecto delimita o L-ácido nucleico de efetivamente todos outros compostos que são usados na terapia de doenças e/ou distúrbios envolvendo a presença de SDF-1. L-ácidos nucleicos que se ligam especificamente a uma molécula-alvo através de um mecanismo diferente de emparelhamento de base de Crick, ou aptâmeros que consistem parcialmente ou completamente em L-nucleotídeos, particularmente com aquelas partes do aptâmero sendo

envolvida n ligação do aptâmero para molécula-alvo, são também denominados spiegelmers.

[000223] Está dentro da presente invenção que a primeira e a segunda extensão de nucleotídeos que flanqueia a sequência de nucleotídeo de núcleo podem, em princípio, hibridizar uma com a outra. Após a hibridização, a estrutura de fita dupla é formada. Será compreendido por um versado na técnica que tal hibridização pode ou não pode ocorrer, particularmente sob condições *in vitro* e/ou *in vivo*. Também, no caso de tal hibridização, não é necessariamente o caso que a hibridização ocorre sobre o comprimento total das duas extensões onde, pelo menos baseado nas regras para emparelhamento base, tal hibridização e, desse modo, formação de uma estrutura de fita dupla pode ocorrer. Conforme preferivelmente usado aqui, uma estrutura de fita dupla é uma parte de uma molécula ou uma estrutura formada por dois ou mais fitas separados, pelo que pelo menos um, preferivelmente dois ou mais pares de base existem que são emparelhamentos bases preferivelmente de acordo com s regras de emparelhamento base de Watson-Crick. Será também compreendido por um versado na técnica que outro emparelhamento base, tal como emparelhamento base de Hoogsten, pode existir em ou formar tal estrutura de fita dupla.

[000224] Está também dentro da presente invenção que os ácidos nucleicos da invenção, indiferente se eles estão presentes como D-ácidos nucleicos, L-ácidos nucleicos ou D,L-ácidos nucleicos, ou se eles são DNA ou RNA, podem estar presentes como ácidos nucleicos de fita simples e de fita dupla. Tipicamente, os ácidos nucleicos da invenção são ácidos nucleicos de fita simples que exibem estruturas secundárias definidas devido a sequência primária e podem, desse modo, também formar estruturas terciárias. Os ácidos nucleicos da invenção, contudo, podem também ser de fita dupla no significado que

duas fitas que são complementares ou parcialmente complementares uma a outra são hibridizados uma com a outra. Isto confere estabilidade ao ácido nucleico que, em particular, será vantajoso se o ácido nucleico está presente na forma D que ocorre naturalmente preferivelmente do que forma L.

[000225] Os ácidos nucleicos da invenção podem ser modificados. Tais modificações podem estar relacionadas ao nucleotídeo simples do ácido nucleico e são bem-conhecidos na técnica. Exemplos para tal modificação são descritos por, entre outros, Venkatesan e outros. (Venkatesan, Kim e outros. 2003) e Kusser (Kusser 2000). Tal modificação pode ser um átomo de H, um átomo de F ou grupo O-CH3 ou grupo NH2 na posição 2' do nucleotídeo individual de que o ácido nucleico consiste. Também, o ácido nucleico de acordo com a presente invenção pode compreende pelo menos um LNA nucleotídeo. Em uma concretização, o ácido nucleico de acordo com a presente invenção consiste em LNA nucleotídeos.

[000226] Em uma concretização, os ácidos nucleicos de acordo com a presente invenção podem ser ácido nucleico multipartido. Um ácido nucleico multipartido conforme aqui usado, é um ácido nucleico que consiste em pelo menos duas fitas de ácido nucleico. Estes pelo menos duas fitas de ácido nucleico formam uma unidade funcional pelo que a unidade funcional é um ligante para uma molécula-alvo. Os pelo menos duas fitas de ácido nucleico podem ser derivados de qualquer dos ácidos nucleicos da invenção por ou clivagem do ácido nucleico para gerar duas fitas ou por sintetização de um ácido nucleico correspondendo a uma primeira parte da invenção, isto é ácido nucleico total e outro ácido nucleico correspondente a segunda parte do ácido nucleico total. É para ser compreendido que ambas a clivagem e a síntese podem ser aplicadas para gerar um ácido nucleico multipartido onde existem mais do que duas fitas conforme

exemplificado acima. Em outras palavras, as pelo menos duas fitas de ácido nucleico são tipicamente diferentes das dois trancados sendo complementares e hibridizando uma a outra embora uma certa extensão de complementaridade entre as várias partes de ácido nucleico possa existir.

[000227] Finalmente, está também dentro da presente invenção que uma estrutura circular, isto é, totalmente fechada para os ácidos nucleicos de acordo com a presente invenção é compreendida, isto é, que os ácidos nucleicos de acordo com a presente invenção são fechados, preferivelmente através de uma ligação covalente, pelo que mais preferivelmente tal ligação covalente é feita entre a extremidade 5' e a extremidade 3' das sequências de ácido nucleico conforme aqui descrito.

[000228] Os presentes inventores descobriram que os ácidos nucleicos de acordo com a presente invenção exibem uma faixa de valor Kd muito favorável.

[000229] Uma possibilidade de determinar a constante de ligação é medição de ressonância de Plasmônio de superfície pelo uso do assim denominado dispositivo de Biacore (Biacore AB, Uppsala, Sweden), que é também conhecido a um versado na técnica. A afinidade conforme preferivelmente usado aqui foi também medida pelo uso de um "ensaio de ligação de enfraquecimento", conforme descrito nos exemplos. Um medição apropriada de modo a expressar a intensidade da ligação entre o ácido nucleico e o alvo que está no presente caso SDF-1, é o assim denominado valor Kd que como tal bem como o método para sua determinação são conhecidos a um versado na técnica.

[000230] Os ácidos nucleicos de acordo com a presente invenção são caracterizados por um certo valor Kd. Preferivelmente, o valor Kd mostrado pelos ácidos nucleicos de acordo com a presente invenção é

abaixo de 1 μM. Um valor Kd de cerca de 1 μM é referido para ser característico para uma ligação não-específica de um ácido nucleico para um alvo. Conforme será compreendido pelos versados na técnica, o valor Kd de um grupo de compostos tais como os ácidos nucleicos de acordo com a presente invenção estão dentro de um certa faixa. O Kd acima mencionado de cerca de 1 μM é um limite superior preferido para o valor Kd. O limite inferior preferido para o Kd de ácidos nucleicos de ligação-alvo pode ser cerca de 10 picomolar ou mais alto. Está dentro da presente invenção que os valores Kd de ligação de ácidos nucleicos para ghrelin está preferivelmente dentro desta faixa. Faixas preferidas podem ser definidas pela escolha de qualquer primeiro número dentro desta faixa e qualquer segundo número dentro desta faixa. Valores superiores preferidos são 250 nM a 100 nM, valores inferiores preferidos são 50 nM, 10 nM, 1 nM , 100 pM e 10 pM.

[000231] As moléculas de ácido nucleico de acordo com a presente invenção podem ter qualquer comprimento provido que elas são ainda capazes de se ligar a molécula-alvo. Será compreendido na técnica que existem comprimentos preferidos dos ácidos nucleicos de acordo com a presente invenção. Tipicamente, o comprimento é entre 15 e 120 nucleotídeos. Será compreendido por aqueles versados na técnica que qualquer inteiro entre 15 e 120 é um comprimento possível para os ácidos nucleicos de acordo com a presente invenção. Faixas mais preferidas para o comprimento dos ácidos nucleicos de acordo com a presente invenção são comprimentos de cerca de 20 a 100 nucleotídeos, cerca de 20 a 80 nucleotídeos, cerca de 20 a 60 nucleotídeos, cerca de 20 a 50 nucleotídeos, e cerca de 20 a 40 nucleotídeos.

[000232] Está dentro da presente invenção que os ácidos nucleicos aqui descritos compreendem uma porção que preferivelmente é uma

porção de alto peso molecular e/ou que preferivelmente permite modificar as características do ácido nucleico em termos de, entre outros, tempo de residência no corpo do animal, preferivelmente o corpo humano. Uma concretização particularmente preferida de tal modificação é PEGilação e HESilação dos ácidos nucleicos de acordo com a presente invenção. Conforme aqui usado, PEG suporta poli(etileno glicol) e HES amido de hidroxietila. PEGilação conforme preferivelmente usado aqui é a modificação de um ácido nucleico de acordo com a presente invenção pelo que tal modificação consiste em uma porção de PEG que é fixada a um ácido nucleico de acordo com a presente invenção. HESilação conforme preferivelmente usado aqui é a modificação de um ácido nucleico de acordo com a presente invenção pelo que tal modificação consiste em uma porção de HES que é fixada a um ácido nucleico de acordo com a presente invenção. Estas modificações, bem como o processo de modificação de um ácido nucleico usando tais modificações, são descritos no pedido de patente Europeu EP 1 306 382, a descrição do qual é aqui incorporada em sua totalidade por referência.

[000233] Preferivelmente, o peso molecular de uma modificação consistindo em ou compreendendo uma porção de alto peso molecular é cerca de 2.000 a 200.000 Da, preferivelmente 40.000 a 120.000 Da, particularmente no caso de PEG sendo tal porção de peso molecular alta, e é preferivelmente cerca de 3.000 a 180.000 Da, mais preferivelmente de 60.000 a 140.000 Da, particularmente no caso de HES sendo tal porção de peso molecular alto. O processo de modificação de HES é, por exemplo, descrito no pedido de patente alemão DE 1 2004 006 249.8, a revelação do qual é aqui incorporada em sua totalidade por referência.

[000234] Está dentro da presente invenção que ou PEG e HES pode ser usado como ou um linear ou ramificado de conforme

adicionalmente descrito nos pedidos de patente WO2005074993 e PCT/EP02/11950. Tal modificação pode, em princípio, ser feita às moléculas de ácido nucleico da presente invenção em qualquer posição destas. Preferivelmente tal modificação é feita ou ao nucleotídeo terminal 5', o nucleotídeo terminal 3' e/ou qualquer nucleotídeo entre o nucleotídeo 5' e o nucleotídeo 3' da molécula de ácido nucleico.

[000235] A modificação e preferivelmente a porção de PEG e/ou HES pode ser fixada à molécula de ácido nucleico da presente invenção ou diretamente ou através de um ligante. Está também dentro da presente invenção que a molécula de ácido nucleico de acordo com a presente invenção compreende uma ou mais modificações, preferivelmente uma ou mais porção de PEG e/ou HES. Em uma concretização, a molécula ligadora individual fixa mais do que uma porção de PEG ou porção de HES a uma molécula de ácido nucleico de acordo com a presente invenção. O ligante usado em conjunto com a presente invenção pode ser ou linear ou ramificado. Estes tipos de ligantes são conhecidos aos versados na técnica e são ainda descritos nos pedidos de patente WO2005074993 e PCT/EP02/11950.

[000236] Sem desejar estar ligado por qualquer teoria, parece que pela modificação dos ácidos nucleicos de acordo com a presente invenção com alta porção de peso molecular, tal como um polímero e mais particularmente os polímeros aqui descritos, que são preferivelmente fisiologicamente aceitáveis, a cinética de excreção é mudada. Mais particularmente, parece que devido ao peso molecular aumentado de tais ácidos nucleicos da invenção modificados e devido aos ácidos nucleicos não serem submetidos ao metabolismo particularmente quando na forma L, a excreção de um corpo de animal, preferivelmente de um corpo de mamífero e, mais

preferivelmente, de um corpo humano, é diminuída. Conforme excreção tipicamente ocorre via os rins, os presentes inventores assumem que a taxa de filtração glomerular do ácido nucleico assim modificado é significantemente reduzida comparada aos ácidos nucleicos não tendo este tipo de modificação de alto peso molecular que resulta em um aumento no tempo de residência no corpo. Em conjunto com isto, é particularmente notável que, apesar de tal modificação de alto peso molecular, a especificidade do ácido nucleico de acordo com a presente invenção não é afetada ema maneira prejudicial. À medida que os ácidos nucleicos de acordo com a presente invenção têm características surpreendentes - que normalmente não podem ser esperadas de compostos farmaceuticamente ativos – tal que uma formulação farmacêutica proporcionando uma liberação sustentada não é necessariamente requerida para proporcionar uma liberação sustentada. Preferivelmente os ácidos nucleicos de acordo com a presente invenção em sua forma modificada compreendendo uma porção de alto peso molecular, podem como tal já serem usados como uma formulação de liberação sustentada. À medida que a(s) modificação(ões) das moléculas de ácido nucleico conforme descritas aqui e as moléculas de ácido nucleico assim modificadas e qualquer composição compreendendo as mesmas podem proporcionar farmacocinéticas distintas, preferivelmente controladas, e biodistribuição destas. Isto também inclui tempo de residência na circulação e distribuição aos tecidos. Tais modificações são adicionalmente descritas no pedido de patente PCT/EP02/11950.

[000237] Contudo, está também dentro da presente invenção que os ácidos nucleicos aqui descritos não compreendem qualquer modificação e particularmente nenhuma modificação de peso molecular tal como PEGilação ou HESilação. Tal concretização é

particularmente preferida quando um folga rápida dos ácidos nucleicos do corpo após administração é desejada. Tal folga rápida pode ser desejada no caso de imagem *in vivo* ou requerimentos de dosagem terapêutica usando os ácidos nucleicos ou medicamentos compreendendo o mesmos, de acordo com a presente invenção.

[000238] Os ácidos nucleicos da invenção, que são também referidos aqui como os ácidos nucleicos de acordo com a presente invenção, e/ou os antagonistas de acordo com a presente invenção, podem ser usados para a geração ou fabricação de um medicamento. Tal medicamento contém pelo menos um dos ácidos nucleicos da invenção, opcionalmente junto com outros compostos farmaceuticamente ativos, pelo que o ácido nucleico da invenção preferivelmente age como o próprio composto farmaceuticamente ativo. Tais medicamentos compreendem em concretizações preferidas pelo menos um veículo farmaceuticamente aceitável. Tal veículo pode ser, por exemplo, água, tampão, PBS, solução de glicose, solução de sacarose, solução de manose, preferivelmente uma soluço equilibrada de 5% de sucrose, amido, açúcar, gelatina ou qualquer outra substância-veículo aceitável. Tais veículos são geralmente conhecidos a um versado na técnica. Será compreendido pelo versado na técnica que quaisquer concretizações, uso e aspectos de ou relacionados ao medicamento da presente invenção é também aplicável à composição farmacêutica da presente invenção, e vice-versa.

[000239] A indicação, doenças e distúrbios para o tratamento e/ou prevenção dos ácidos nucleicos, as composições farmacêuticas e medicamentos de acordo com ou preparados de acordo com a presente invenção resulta do envolvimento, ou direto ou indireto, de SDF-1 no respectivo mecanismo patogênico.

[000240] Naturalmente, devido aos ácidos nucleicos de ligação de SDF-1 de acordo com a presente invenção interagirem com ou se

ligarem a SDF-1 humana ou de murina, um versado na técnica geralmente compreenderá que os ácidos nucleicos de ligação de SDF-1 de acordo com a presente invenção podem facilmente ser usados para o tratamento, prevenção e/ou diagnose de qualquer doença conforme descrito aqui de seres humanos e animais. Em conjunto com isto, é para ser compreendido que as moléculas de ácido nucleico de acordo com a presente invenção podem ser usadas para o tratamento e prevenção de qualquer das doenças, distúrbio ou condição aqui descritos, indiferente do modo de ação de tal doença, distúrbio e condição.

[000241] Em seguida, o racional para o uso das moléculas de ácido nucleicos de acordo com a presente invenção em conjunto com as várias doenças, distúrbios e condições é provido, tornando, desse modo, a aplicabilidade terapêutica reivindicada, preventiva e diagnóstica das moléculas de ácido nucleico de acordo com a presente invenção plausível. De modo a evitar qualquer repetição desnecessária, deve ser compreendido que devido ao envolvimento do eixo SDF-1 - receptor de SDF-1 conforme esboçado em conjunto com este, referido eixo pode ser determinado pelas moléculas de ácido nucleico de acordo com a presente invenção tal que o efeito terapêutico reivindicado, preventivo e diagnóstico é alcançado. Deve, além disso, ser compreendido que as particularidades das doenças, distúrbios e condições, dos pacientes e qualquer detalhe do regime de tratamento descrito em conjunto com este, podem ser submetidos a concretizações preferidas do presente pedido.

[000242] O aumento das células-tronco e/ou células progenitoras no sangue e, mais especificamente, sangue periférico, é, entre outros, proveitoso nos tratamentos para aliviar os efeitos de protocolos que afetam adversamente a medula óssea, tais como aqueles que resultam em leucopenia. Estes são efeitos colaterais conhecidos de

quimioterapia e radioterapia. Os ácidos nucleicos da presente invenção também aumentam o sucesso do transplante da medula óssea, aumenta cura de ferida e tratamento de queimadura, e auxilia na restauração de tecido de órgão danificado. Eles também combatem infecções bacteriais que são predominantes na leucemia. As moléculas de ácido nucleico de acordo com a presente invenção podem ser usadas para qualquer tal proposta e tratamento e prevenção, respectivamente de tal doença e condição.

Mobilização de célula-tronco para regeneração de tecidos.

[000243] Nos casos de dano de órgão, por exemplo, devido ao mau funcionamento da vasculatura ou trauma, a regeneração do tecido é desejável, mas frequentemente não alcançada. As células-tronco da medula óssea, preferivelmente células-tronco autólogas, têm sido mostradas terem efeitos benéficos em uma variedade de modelos de animal de doenças, e têm se comprovado benéficas em alguns exemplos em seres humanos.

Reparo da retina e do epitélio de pigmento retiniano.

[000244] Células-tronco derivadas da medula óssea têm sido investigadas nos modelos de camundongo de doenças vascular retiniano e degenerativas. Estas células-tronco foram mostradas aderirem a locais de dano, para estabilizar vasculatura anormal e para acelerar neovascularização de áreas hipóxicas se injetadas intravitrealmente ou sub-retinalmente (Friedlander e outros, 2007; Otani e outros, 2002). Outros verificaram que um subgrupo de células-tronco derivadas de medula óssea que tinham sido mobilizadas com G-CSF que tem como alvo o epitélio de pigmento retinianol em locais de dano. Além da administração sistêmica, nenhuma coleta e injeção intra-ocular de células-tronco foi verificada ser necessária. Ao contrário, a atração ao local de dano/avaria foi alcançada pela sobre expressão transiente localizada de quimiocinas, por exemplo, SDF-1

(Li e outros, 2007; Li e outros, 2006).

Reparo cardíaco.

[000245] Evidência cumulativa indica que o miocárdio responde ao crescimento ou dano por recrutamento de células-tronco e/ou células progenitoras que participam no reparo e processos regenerativos. Em um modelo de camundongo de infarto cardíaco, Fransioli e outros. mostraram que células c-kit+, que são células-tronco, acumulam-se 1-2 semanas pós-infarto na área infartada, mais provavelmente para contribuir para processos de reparo (Fransioli e outros, 2008). Dawn e outros. reportaram na utilidade terapêutica potencial de Sca-1+/Lin-/CD45 derivada de medula óssea – células-tronco similares a embriônicos muito pequenos (abrev. VSELs).

[000246] Em um modelo de camundongo de infarto miocardial (abrev. MI), o transplante de um número relativamente pequeno de CD45- VSELs foi suficiente pra aperfeiçoar a função ventricular esquerda e aliviar hipertrofia miócita após MI (Dawn e outros, 2008).

Reparo e melhora de inflamação após acidente vascular cerebral isquêmico. Schwarting e outros.

[000247] Investigaram os efeitos de injeção de célula-tronco hematopoiética Lin(-) marcada por peptídeo verde-fluorescente na dimensão do infarto, morte de célula apoptótica, inflamação pós-isquêmica e transcrição de gene de citocina em um modelo de camundongo de dano de cérebro isquêmico. 24 horas após injeção, as células foram encontradas no baço e mais tarde no parênquima do cérebro isquêmico, expressando proteínas marcadoras microglial, mas neural. A avaliação do dano do tecido mostrou volumes de infarto significantemente menor e menos morte de célula neuronal apoptótica em áreas de peri-infarto de animais tratados com célula-tronco hematopoiética Lin(-). A análise de infiltração de célula imune em hemisférios isquêmicos revelou uma redução de invasão de células T

e macrófagos nos camundongos tratados (Schwarting e outros, 2008). Imitola e outros. tinham reportado anteriormente que células-tronco neuronais são atraídas para locais de dano de sistema nervoso central (abrev. CNS) via a trajetória SDF-lα/CXCR4.

[000248] À luz destas descobertas, a mobilização de um número suficiente de células-tronco de medula óssea é provavelmente par ser benéfico para induzir processos de reparo (Tang e outros, 2007). O bloqueio de SDF-1 ou seu receptor de CXCR4 é uma aproximação promissora neste campo, visto que ele mobiliza uma variedade de células-tronco da medula óssea. Doses corretas, esquemas de dosagem e localização potencialmente do agente de mobilização podem ser determinadas por um versado na técnica realizando experimentação de rotina, pelo que é preferivelmente pretendido que as células-tronco são mobilizadas, mas são ainda capazes de responder a sinais quimiotáticos, de modo que elas podem ser recrutadas para locais de dano de tecido.

[000249] Devido à molécula de ligação de SDF-1 de ácidos nucleicos de acordo com a presente invenção inibir a sinalização entre SDF-1 e o receptor de SDF-1, tal molécula de ligação de SDF-1 de ácidos nucleicos pode ser usada para a geração de um medicamento que pode ser usado para mobilização de célula progenitora e/ou células-tronco no sangue periférico, e/ou para o tratamento de doenças e/ou distúrbios preferivelmente selecionados do grupo compreendendo cura de ferida; queimadura; distúrbios causados por ou associados com tecido de órgão danificado e/ou vasculatura danificada, pelo que tais distúrbios são selecionados de dano retiniano e coroidal, acidente vascular cerebral, dano no miocárdio, infarto no miocárdio, isquemia após transplante de órgão e dano traumático; e distúrbios hematopoiéticos, pelo que tais distúrbios são selecionados de anemia aplástica, leucemia, anemia induzida por fármaco e leucopenia, e

infecção bacteriana em leucopenia.

[000250] Para mobilização da célula progenitora e/ou célula-tronco, o medicamento pode ser usado em combinação com um segundo agente farmaceuticamente ativo, pelo que a função de referido segundo agente farmaceuticamente ativo é mobilização da célula progenitora e/ou células-tronco. Agentes de mobilização de célula são selecionados de, mas não restritos a, fator de estimulação de colônia de granulócito-macrófago (abrev. GM-CSF), Interleukin-8 (abrev. IL-8), proteína inflamatória de macrófago (abrev. MIP), oncogene relacionada ao crescimento, agentes de bloqueio de CXCR4 similares a AMD3001 (Aiuti, Webb e outros. 1997) e fator de estimulação de colônia de granulócito (abrev. G-CSF).

[000251] Em casos de dano de CNS, o uso de um inibidor de SDF-1 macromolecular para a mobilização de células-tronco derivadas de medula óssea pode ser especialmente benéfico. Enquanto as células são ainda sensíveis a gradiente de SDF-1, estas são mascaradas pelo inibidor de SDF-1 macromolecular nos tecidos periféricos considerando-se que uma concentração suficientemente alta é mantida no corpo. Contudo, desde que o inibidor de SDF-1 macromolecular não pode atravessar a barreira do sangue do cérebro, gradientes de SDF-1 originam-se de sobre expressão de SDF-1 em locais de hipóxia ou dano de CNS, persistem no CNS e podem atrair algumas das células mobilizadas ao local de dano onde eles podem servir conforme descrito acima. Em uma concretização preferida, tal inibidor de SDF-1 macromolecular é uma molécula de ácido nucleico de acordo com a presente invenção.

<u>Combinação de bloqueio de SDF-1 e quimioterapia.</u>

[000252] Aproximadamente 20% de leucemias linfoblásticas agudas de linhagem B não são curadas por quimioterapia tradicional. Experimentos pré-clínicos usando células leucêmicas ex vivo em

cocultura com células estromais têm proporcionado evidência que a interação de blastos leucêmicos com componentes de medula óssea protege as células leucêmicas contra quimioterapia (Mudry, Fortney e outros. 2000; Garrido, Appelbaum e outros. 2001; Tabe, Jin e outros. 2007). Existem também relatórios a cerca de modelos de camundongo em que a inibição de moléculas de superfície de célula que são importantes para adesão de célula e, desse modo, residência de (malignidade) células hematopoiéticas, aperfeiçoa a eficácia de quimioterapia, e conduz a erradicação de células leucêmicas troncos (Matsunaga, Takemoto e outros. 2003; Jin, Hope e outros. 2006). SDF-1 é conhecido por desempenhar um papel importante na residência e retenção de células-tronco em nichos de medula óssea. Existe acúmulo pré-clínico e um relatório de evidência clínica que o bloqueio de CXCR4, um receptor de SDF-1 em células hematopoiéticas, conduz a liberação também de blasto de leucemia mieloide aguda da medula óssea no sangue periférico, onde eles podem ser alvejados por quimioterapia (por exemplo, pelo agente citarabina) (Fierro, Brenner e outros. 2008) ou outros agentes que conduzem a morte da célula de tumor (por exemplo, biológicos sozinhos ou com citotoxicidade mediada por célula mediada por célula dependente de anticorpo ou citotoxicidade dependente de complemento). Adicionalmente, Jin e outros. observaram recentemente que tratamento de leucemia mielógena crônica com inibidores de tirosina quinase (por exemplo, imatinib) conduz a uma regulação ascendente de CXCR4 em células leucêmicas. Isto resulta em residência de medula óssea aumentado e induz um bloco de ciclo de G0-G1 que tornaram as células quiescentes e insensíveis a aproximações adicionais de quimioterapia (Jin, Tabe e outros. 2008). À luz disto, a presente invenção sugere uma terapia de combinação de um agente quimioterapêutico junto com um CXCR4 ou um inibidor de

SDF-1 similar a Molécula de ligação de SDF-1 de ácidos nucleicos de acordo com a presente invenção, incluindo, mas não-limitado a, NOX-A12-JE40, de modo a diminuir a residência da medula óssea de células leucêmicas e para mobilizar células quiescentes leucêmicas que foram resididas no medula óssea antes. Devido a falta de sinais de nicho, as células podem progredir através do ciclo de célula e são, portanto, mais sensíveis a quimioterapia. A quimioterapia e agentes respectivos usados em conjunto com estes são conhecidos na técnica e, por exemplo, anticorpos tais como Rituximab, Ibritumomab tiuxetan, Tositumomab; agentes de alquilatação tais como cisplatina e carboplatina, bem como oxaliplatin, mecloretamina; ciclofosfamida, clorambucila; antimetabólitos tais como purineazatioprina, mercaptopurina; alcaloides de planta e terpenoides tais como alcaloides vinca e taxanos; podofilotóxi; epotilona; e inibidores de topoisomerase tais como camptotecinas.

[000253] Portanto, o medicamento conforme aqui descrito pode ser usado para mobilização de células de câncer no sangue periférico de um indivíduo, pelo que as células de câncer são selecionadas, mas não restritas ao grupo de células leucêmicas, células de mieloma, células de linfoma, células de troncos de câncer, células de câncer com potência metastática e metástase de câncer.

[000254] O medicamento de acordo com a presente invenção pode ser usado em combinação com um segundo medicamento ou um segundo agente farmaceuticamente ativo que pode ser usado para a mobilização das células de câncer no sangue periférico do indivíduo. O segundo agente farmaceuticamente ativo compreende agentes de mobilização de células aqui descritos antes.

[000255] Além disso, os medicamentos de acordo com a presente invenção podem ser usados em combinação com um terceiro medicamento ou terceiro agente farmaceuticamente ativo, pelo que o

terceiro agente farmaceuticamente ativo danifica, destrói e/ou etiqueta as células de câncer. Tais agentes de medicamento que destroem as células de câncer são preferivelmente selecionados de, mas não restritos a, grupo de anticorpos tais como Rituximab, Ibritumomab tiuxetan, Tositumomab; agentes de alquilatação tais como cisplatina e carboplatina, bem como oxaliplatina, mecloretamina; ciclofosfamida, clorambucila; antimetabólitos tais como purineazatioprina, mercaptopurina; alcaloides de planta e terpenoides tais como alcaloides de vinca e taxanos; podofilotóxi; epotilona; inibidores de topoisomerase tais como camptotecinas.

[000256] O terceiro medicamento ou agente farmaceuticamente ativo tem ou pode proporcionar a função de uma quimioterapia.

[000257] Os medicamentos que etiquetam as células de câncer conduzem a uma ativação de defesas do corpo direcionadas desse modo, célula de câncer etiquetada, pelo que os medicamentos que etiquetam as células de câncer são selecionados de, mas não-restritos ao grupo de anticorpos monoclonais. Eles operam por etiquetamento de antígenos específicos de tumor, intensificando, desse modo, a resposta imune do hospedeiro para células tumor que o agente se fixa. Exemplos são trastuzumab (nome comercial Herceptin), cetuximab, e rituximab (nomes comerciais: Rituxan ou Mabthera).

[000258] A terapia de combinação do medicamento de acordo com a presente invenção pode ser feita com o segundo e/ou o terceiro medicamento.

[000259] O indivíduo que é tratado com o medicamento para mobilização das células de câncer pode subsequentemente ou concomitantemente suportar radioterapia. Em uma concretização, a radioterapia pode ser usada como um tratamento alternativo para o terceiro medicamento ou o terceiro agente farmaceuticamente ativo.

[000260] O medicamento de acordo com a presente invenção, em

combinação com ou sem o segundo medicamento ou segundo agente farmaceuticamente ativo, com ou sem o terceiro medicamento ou terceiro agente farmaceuticamente ativo, e com ou sem radioterapia, pode ser usado para o tratamento e/ou prevenção de câncer, preferivelmente tumores sólidos e malignidades hematológicas, mais preferivelmente leucemia, linfoma, e mieloma, pelo que preferivelmente o medicamento de acordo com a presente invenção é usado em combinação com o terceiro medicamento ou radioterapia.

Células de plasma de longa vida, célula B e mobilização de célula T de memória em doença autoimune

[000261] As células B, e/ou células T de memória retornam do corpo para a medula óssea e possivelmente outros locais, por exemplo, nodos de linfa, e/ou são mantidos ali pelo gradiente de SDF-1 que é formado pela expressão de SDF-1 de células estromais (Parretta, Cassese e outros. 2005; Zhang, Nakajima e outros. 2005; Radbruch, Muehlinghaus e outros. 2006). Nos nichos, estas células estão em um estado dormente pelo que elas não são sensíveis a fármacos de modificação de doença (por exemplo, fármacos cito estáticos ou metotrexato) que são normalmente usadas para o tratamento de doenças autoimunes. Uma vez que elas deixam o nicho, elas podem se dividir prontamente e começarem a montar uma resposta imune renovada se elas encontram seu antígeno cognato possivelmente conduzindo a doença autoimune perpetuada. A interferência com o gradiente de SDF-1 no medula óssea e outros nichos por ácidos nucleicos de ligação de SDF-1 ou bloqueio de CXCR4 pode conduzir a mobilização de células B e/ou células T, e permite sua depleção a partir do sangue via aférese, ou alvajando-as com um medicamento apropriado.

[000262] Após uma resposta imune com produção de anticorpo ativo por células B terminalmente diferenciadas (células de plasma), a

maioria destas células morrem com a resolução da inflamação ou a eliminação do antígeno estranho (por exemplo, proteína de vírus). Existe, contudo, uma minoria de células B de memória que pode ser girada em plasmablastos com a ajuda de uma célula T. Estes plasmablastos têm a capacidade de migrar em resposta ao estímulo quimiotático nos nichos onde eles sobrevivem como células de "memória" de longa vida por anos. Durante a transição, as células perdem a expressão de CXCR5 e CCR7 e não mais migram para os respectivos ligantes. A expressão de CXCR4, contudo, é mantida. Desse modo, as células mover-se-ão para os locais de expressão de SDF-1, onde elas encontram sinais de sobrevivência de longo prazo, que podem ser distintos de ou complementares a SDF-1 (Minges Wols e outros, 2007). Estes nichos podem ser ambos em medula óssea e na periferia, por exemplo, em tecidos inflamados. As células de plasma de longa vida são mais provavelmente responsáveis pela manutenção das titulações de plasma de anticorpo protetor que são frequentemente mantidas por anos após uma infecção ou uma vacinação (Tarlinton e outros, 2008). As células de plasma não são susceptíveis a fármacos de modificação de doença como outras células B e T, mais provavelmente porque elas não se dividem. Além disso, elas não podem ser alvejadas por tratamento de anticorpo de anti-CD20, visto que as células de plasma não transportam CD20. Nas doenças autoimunes que são mantidas pelos autoanticorpos secretados por células de plasma e células de plasma de longa vida, seria benéfico eliminar estas células, de modo que o sistema imune cessaria o ataque do autotecido. Um método para exaurir o sangue de um paciente de células de plasma pode ser feito por aférese, por exemplo, usando anticorpo anti-CD138 (syndecan-1) em uma matriz de afinidade (por exemplo, uma coluna ou esferas) (Minges Wols & Witte, 2008; Wijdenes e outros, 1996). De modo a eliminar não

somente a circulação de células de plasma, mas também células de plasma de longa vida residentes, seria favorável mobilizar a última de seus nichos. Isto pode ser feito pela administração sistêmica de uma Molécula de ligação de SDF-1 de ácido nucleico de acordo com a presente invenção que destrói os gradientes de SDF-1 e mobilizam estas células que se movem em direção a SDF-1 no sangue periférico.

[000263] Portanto, o medicamento de acordo com a presente invenção pode ser usado para mobilização de células de plasma de longa vida, células de plasma de longa vida, células B e/ou células T no sangue periférico de um indivíduo.

[000264] O medicamento de acordo com a presente invenção pode ser usado em combinação com um segundo medicamento ou segundo agente farmaceuticamente ativo que pode ser usado para a mobilização das células de plasma de longa vida, células B e/ou células T no sangue periférico do indivíduo. O segundo medicamento ou agente farmaceuticamente ativo compreende agentes de mobilização de célula aqui descritos antes, mas não restritos a estes.

[000265] Enquanto as células são mobilizadas por um medicamento de acordo com a presente invenção sozinho ou em combinação com um segundo medicamento ou agente farmaceuticamente ativo conforme descrito acima, eles podem ser desprovidos de sangue por aférese, classificação de célula e/ou citometria de fluxo (por exemplo, por classificação de célula ativada por fluorescência [FACS] e/ou classificação de célula ativada magnética [MACS] com marcadores de célula de plasma de longa vida, célula B ou célula T de superfície).

[000266] Além disso, o medicamento de acordo com a presente invenção pode ser usado em combinação com um terceiro medicamento ou terceiro agente farmaceuticamente ativo, pelo que o terceiro medicamento ou terceiro agente farmaceuticamente ativo danifica, destrói e/ou etiqueta as células de plasma de longa vida,

células B e/ou células T no sangue periférico. Tais medicamentos que destroem as células de plasma de longa vida, células B e/ou células T são selecionados de, mas não restritos a, fármacos de modificação de doença, por exemplo, metotrexato ou agentes citotóxicos. Exemplos de medicamentos que etiquetam as células de plasma de longa vida, células B e/ou células T conduzem a uma ativação da defesa do corpo direcionada a células de plasma de longa vida etiquetadas, células B e/ou células T incluem aqueles, mas não-limitados a, selecionados do grupo consistindo em rituximab, anticorpos de ligação de receptor de IL-6 ou anticorpos de ligação de syndecan-1.

[000267] A terapia de combinação do medicamento de acordo com a presente invenção pode ser feita com o segundo e/ou o terceiro medicamento.

[000268] O indivíduo que é tratado de acordo com a presente invenção com o medicamento de acordo com a presente invenção para mobilização das células de plasma de longa vida, células B e/ou células T pode subsequentemente ou concomitantemente suportar radioterapia, que danifica ou destrói a divisão das células do sistema imune do paciente, que por último o ataca. A radioterapia pode ser usada como tratamento alternativo para o terceiro medicamento. O uso do medicamento de acordo com a presente invenção, em combinação com ou sem o segundo medicamento ou segundo agente farmaceuticamente ativo, com ou sem o terceiro medicamento ou terceiro agente farmaceuticamente ativo, e com ou sem radioterapia, pode ser usado para o tratamento e/ou prevenção de doenças autoimunes , mobilização de células de plasma de longa vida, células B e/ou células T sozinhas ou dentro de um conceito terapêutico mais complexo pode ser benéfico para o tratamento de várias doenças incluindo, mas não-limitadas a, doenças autoimunes sistêmicas pelo que tal doença autoimune sistêmica é preferivelmente selecionada de

alergia, anemia hemolítica autoimune quente ou fria, síndrome de resposta inflamatória sistêmica, choque hemorrágico, diabetes tipo 1, escleroderma difuso, policondrite, síndrome autoimune poliglandular, lúpus eritematoso sistêmico e manifestações desta, artrite reumatoide, doença reumática no olho, cérebro, pulmão, rins, coração, fígado, trato gastrointestinal, baço, pele, ossos, sistema linfático, sangue ou outros órgãos; doenças autoimunes do trato gastrointestinal pelo que tal doença autoimune do trato gastrointestinal é preferivelmente selecionada de doença de Crohn, colite ulcerosa, doença celíaca, intolerância ao glúten, doença inflamatória do intestino, pancreatite, esofagite eosinofílica; doenças autoimunes da pele pelo que tal doença autoimune da pele é preferivelmente selecionada de psoríase, urticária, dermatomiosite, pêndigovulgaris, pêndigofoliaceus, bullous pemfigoide, escleroderma Morphea/linear, vitiligo, dermatite herpetiformis ou doença de Duhring, esclerose de líquen;

[000269] doenças autoimunes da vasculatura pelo que tal doença autoimune da vasculatura é preferivelmente selecionada de vasculitides, preferivelmente arterite temporalis, vasculite, derrame vascular, polimialgia reumática, aterosclerose, síndrome de Churg-Strauss, arterite de Takayasu, síndrome de Goodpasture, preferivelmente afetando mais os rins, mais especificamente o glomeruli, e também afetando mais os pulmões, glomerulonefrite, poliarterite nodosa, doença de Behcet; doenças autoimunes do sistema nervoso pelo que tal doença autoimune do sistema nervoso é preferivelmente selecionada de esclerose múltipla, polineuropatia de demielinação inflamatória crônica, disfunção neurocognitiva, síndrome de stiff-man, síndrome de Guillain-Barre, miastenia gravis, síndrome de Lambert-Eaton;

[000270] doenças autoimunes do esqueleto musculares pelo que tal doença autoimune do esqueleto muscular é preferivelmente

selecionada de espodilite de anquilosação, sarcoidose, polimialgia reumática, polimiosite, artrite psoriática, febre reumática, policondrite, fibromialgia, artrite reumatoide juvenil, doença de Lyme, artrite reativa, espondiloartropatia, doença de junta degenerativa;

[000271] e outras doenças autoimunes pelo que tais outras doenças autoimunes são preferivelmente selecionadas de síndrome de Cogan, adrenalite autoimune, doença de Meniere, inflamações locais, alopecia areata, doenças inflamatórias agudas, cirrose biliar primária, síndrome de Sjorgen, escleroderma tais como escleroderma difuso, síndrome de CREST e/ou escleroderma Morphea/linear, uveíte autoimune, tireoidite de Hashimoto, doença Graves, hepatite autoimune, glomerulonefrite, síndrome de antifosfolipídeo, fibrose pulmonar idiopática, infertilidade autoimune, distúrbios complexos imunes e peritonite.

[000272] Além disso, o uso do medicamento de acordo com a presente invenção, em combinação com ou sem o segundo medicamento ou segundo agente farmaceuticamente ativo, pode ser usado para o tratamento e/ou prevenção de doença de enxerto versus hospedeiro após transplante de medula óssea e para rejeição de transplante de órgãos transplantados que são preferivelmente selecionados de fígado, rim, intestino, pulmão, coração, pele, membros, córnea, ilhas de Langerhans, medula óssea, vaso sanguíneos e pâncreas.

[000273] Em um modelo de camundongo de doença de via aérea alérgica, um VXCR4 de alvejamento de anticorpo nos leucócitos reduz hipersensibilidade da via aérea e eosinofilia de pulmão, indicando que sinais mediados por CXCR4 contribuem para inflamação do pulmão (Gonzalo, Lloyd e outros. 2000). Existe também evidência que SDF-1 contribui para angiogênese. Evidência clínica e experimental indica que leucócitos de infiltração da pele desempenham um papel crucial na iniciação e manutenção de dermatite atópica e tem sido mostrado

que SDF-1 é um fator importante para o recrutamento de T-linfócitos e células dendríticas, (Gombert, Dieu-Nosjean e outros. 2005). Desde que leucócitos e especificamente células T expressam o receptor de SDF-1, CXCR4, e respondem quimiotaticamente aos gradientes de SDF-1, o rompimento destes gradientes por ligação de SDF-1 e neutralização de ácido nucleico de acordo com a presente invenção é adequado para ajudar em doenças inflamatórias com ampliação de inflamação com e sem origem bacterial ou viral, inflamação do pulmão e/ou da pele, preferivelmente psoríase.

[000274] Artrite reumatoide é doença autoimune potencialmente sistêmica que usualmente começa nas juntas pequenas das mãos e pés. Sua marca é a inflamação da membrana sinovial e que é caracterizada por infiltração da membrana e do tecido circundante pelos leucócitos, especialmente macrófagos, células T e células B. Este processo e a secreção de proteases e citocinas pró-inflamatórias conduz ao espessamento da membrana sinovial e o crescimento de um tecido de esponja, denominado pannus. Isto se prolifera em volta da junta e invasivamente no osso e na cartilagem conduzindo à sua destruição irreversível. O pannus dispara a formação de neovasculatura para seu próprio suprimento de sangue. Iwamoto e outros. verificou recentemente que um número de quimiocinas é elevado no tecido sinovial e o fluido sinovial de pacientes de RA, entre eles está SDF-1 (Iwamoto e outros, 2008). A regulação ascendente de SDF-1 tinha também sido mostrada previamente in vitro pela adição de fluido sinovial de pacientes de RA para sinoviócitos similares a fibroblasto cultivados. Este fluido ou a adição de expressão de SDF-1 mRNA induzida por IL-17 pelos sinoviócitos. A indução de expressão de SDF-1 pode ser anulada pela adição de anticorpos anti-IL17 (Kim e outros, 2007). No contexto de uma junta inflamada, SDF-1 pode agir em uma maneira tripla. Primeiro como um quimioatraente para

leucócitos, segundo como atraente para células progenitoras endoteliais que são necessárias para angiogênese, ou terceiro como um disparador de expressão de fator de crescimento a jusante, tal como VEGF, que então conduz ao crescimento de neovasculatura.

[000275] Baseado nestes experimentos, os inventores assumem que um medicamento que é usado para inibição de migração de leucócitos, preferivelmente do sangue periférico para um tecido, pode permitir o tratamento e/ou prevenção de doenças e/ou distúrbios conforme segue.

[000276] A migração de leucócitos pode ser iniciada por não-autoantígenos de órgãos transplantados, pelo que os órgãos transplantados são selecionados de fígado, rim, intestino, pulmão, coração, pele, membros, córnea, ilhas de Langerhans, medula óssea, vaso sanguíneos e pâncreas. Portanto, um medicamento que conduz a uma inibição de migração de leucócitos pode ser usado para a prevenção e/ou tratamento de rejeição de transplante de órgãos transplantados conforme aqui descrito.

[000277] Além disso, a migração de leucócitos pode ser iniciada por inflamação que ocorre em ou está associado com doenças autoimunes sistêmicas pelo que tal doença autoimune sistêmica é preferivelmente selecionada de alergia, anemia hemolítica autoimune quente ou fria, síndrome de resposta inflamatória sistêmica, choque hemorrágico, diabetes tipo 1, escleroderma difuso, policondrite, síndrome autoimune poliglandular, lúpus eritematoso sistêmico e manifestações desta, artrite reumatoide, doença reumática no olho, cérebro, pulmão, rins, coração, fígado, trato gastrointestinal, baço, pele, ossos, sistema linfático, sangue ou outros órgãos; doenças autoimunes do trato gastrointestinal pelo que tal doença autoimune do trato gastrointestinal é preferivelmente selecionada de doença de Crohn, colite ulcerosa, doença celíaca, intolerância à glúten, doença inflamatória do intestino,

pancreatite, esofagite eosinofílica; doenças autoimunes da pele pelo que tal doença autoimune da pele é preferivelmente selecionada de psoríase, urticária, dermatomiosite, pêndigovulgaris, pêndigofoliaceus, bullous pemfigoide, escleroderma Morphea/linear, vitiligo, dermatite herpetiformis ou doença de Duhring, esclerose de líquen;

[000278] doenças autoimunes da vasculatura pelo que tal doença autoimune da vasculatura é preferivelmente selecionada de vasculitides, preferivelmente arterite temporalis, vasculite, derrame vascular, polimialgia reumática, aterosclerose, síndrome de Churg-Strauss, arterite de Takayasu, síndrome de Goodpasture, preferivelmente afetando mais os rins, mais especificamente o glomeruli, e também afetando mais os pulmões, glomerulonefrite, poliarterite nodosa, doença de Behcet; doenças autoimunes do sistema nervoso pelo que tal doença autoimune do sistema nervoso é preferivelmente selecionada de esclerose múltipla, polineuropatia de demielinação inflamatória crônica, disfunção neurocognitiva, síndrome de stiff-man, síndrome de Guillain-Barre, miastenia gravis, síndrome de Lambert-Eaton;

[000279] doenças autoimunes do esqueleto musculares pelo que tal doença autoimune do esqueleto muscular é preferivelmente selecionada de espodilite de anquilosação, sarcoidose, polimialgia reumática, polimiosite, artrite psoriática, febre reumática, policondrite, fibromialgia, artrite reumatoide juvenil, doença de Lyme, artrite reativa, espondiloartropatia, doença de junta degenerativa;

[000280] e outras doenças autoimunes pelo que tais outras doenças autoimunes são preferivelmente selecionadas de síndrome de Cogan, adrenalite autoimune, doença de Meniere, inflamações locais, alopecia areata, doenças inflamatórias agudas, cirrose biliar primária, síndrome de Sjorgen, escleroderma tais como escleroderma difuso, síndrome de CREST e/ou escleroderma Morphea/linear, uveíte autoimune, tireoidite

de Hashimoto, doença Graves, hepatite autoimune, glomerulonefrite, síndrome de antifosfolipídeo, fibrose pulmonar idiopática, infertilidade autoimune, distúrbios complexos imunes e peritonite.

[000281] Portanto, um medicamento que conduz a uma inibição ou redução de migração de leucócitos pode ser usado para a prevenção e/ou tratamento de inflamação que ocorre em ou está associada às doenças autoimunes conforme aqui descrito.

[000282] Conforme mostrado no modelo de camundongo de doença de via aérea alérgica, o medicamento que conduz a uma inibição de migração de leucócitos pode ser eficaz no tratamento e/ou prevenção de reações alérgicas da pele e/ou da mucosa de vias aéreas, preferivelmente febre de feno, asma, hipersensibilidade da via aérea e/ou dermatite, preferivelmente dermatite de contato e/ou dermatite atópica.

[000283] A mobilização de células progenitoras e/ou células-tronco pelo ácido nucleico de acordo com a presente invenção proporciona um método para obtenção destas células de um indivíduo. Desse modo, uma quantidade eficaz das moléculas de ácido nucleico de acordo com a invenção é administrada a um indivíduo, conduzindo a mobilização de células progenitoras e/ou células-tronco no sangue periférico do indivíduo. As células podem ser coletadas do indivíduo, do sangue periférico do indivíduo respectivamente, por aférese, leucoferese, classificação de célula e/ou citometria de fluxo conforme aqui descrito.

[000284] Após coleta das células progenitoras e/ou células-tronco do indivíduo, o indivíduo, preferivelmente um primeiro indivíduo, pode suportar subsequentemente ou concomitantemente quimioterapia ou radioterapia.

[000285] Quimioterapia e terapia de radiação geralmente afetam as células que se dividem rapidamente. Elas são usadas para tratar

câncer porque as células de câncer dividem-se mais frequentemente do que as células mais saudáveis. Contudo, devido as células de medula óssea também se dividirem frequentemente, tratamentos de dose alta pode danificar severamente ou destruir a medula óssea do paciente. Sem medula óssea saudável, o paciente não é mais capaz de produzir células de sangue necessárias para transportar oxigênio, infecção, e prevenir sangramento, transplante de célula-tronco de sangue periférico substitui as células-tronco que foram destruídas pelo tratamento. As células-tronco transplantadas saudáveis podem restaurar a capacidade da medula óssea produzir as células de sangue que o paciente necessita.

[000286] O transplante de célula-tronco de sangue periférico é mais comumente usado no tratamento de leucemia e linfoma. Ele é mais eficaz quando a leucemia ou linfoma está em remissão (os sinais e sintomas de câncer tenham desaparecido). O transplante de célula-tronco de sangue periférico é também usado para tratar outros cânceres tal como neuroblastoma (câncer que ocorre em células nervosas imaturas e afetam muitas crianças) e mieloma múltiplo. Os pesquisadores estão avaliando o transplante de célula-tronco de sangue periférico em ensaios clínicos (estudos de pesquisa) para o tratamento de vários tipos de câncer(NCI, 2001).

[000287] Conforme mostrado nas Figuras 41 e 43, vários tipos de câncer como leucemia e tumores sólidos, distúrbios linfoproliferativos distúrbios não-malígnos tais como doenças autoimunes, distúrbios hematopoiéticos podem ser tratados por transplante de célula-tronco hematopoiética alogênica e/ ou autóloga (abrev. HSCT) (Gratwohl, Baldomero e outros. 2002).

[000288] Se a quimioterapia ou radioterapia foi subsequentemente feita no preferivelmente primeiro indivíduo, pelo que a quimioterapia ou radioterapia foi preferivelmente feita ou administrada de modo a

danificar ou destruir células de tumor, as células progenitoras e/ou células-tronco coletadas do preferivelmente primeiro indivíduo podem ser administradas de volta no sangue periférico do preferivelmente primeiro indivíduo. Alternativamente, um segundo indivíduo pode contribuir suas células progenitoras e/ou células-tronco coletadas para o primeiro indivíduo, que tem baixo nível de células progenitoras e/ou células-tronco ou aquelas células progenitoras e/ou células-tronco destruídas antes, por exemplo, por quimioterapia ou radioterapia.

[000289] O método pode ser usado para o tratamento de câncer, preferivelmente tumores sólidos, tumores hematológicos ou malignidades.

[000290] Em doença autoimune incluindo, mas não-limitada a, por exemplo, lúpus eritematoso, artrite reumatoide, especialmente em casos severos, uma das opções de terapia é fazer uma mieloablativa ou um regime de terapia linfoablativa mais seletiva e retornar o sistema hematopoiético ao paciente em seguida (Burt, Marmont e outros. 2006). As células-tronco hematopoiéticas e células progenitoras hematopoiéticas que são necessárias para o enxerto do sistema hematopoiético são eficientemente imobilizadas pelas moléculas de ácido nucleicos de acordo com a presente invenção incluindo, mas não-limitado a, ligação de SDF-1 SpiegelmerNOX-A12-JE40, ou por outra estratégia de bloqueio de SDF-1, ou de seu respectivo receptor CXCR4.

[000291] Alternativamente células-tronco hematopoiéticas/células progenitoras hematopoiéticas são coletadas do sangue e são usadas para reconstituir o sistema imune do paciente após ablação do sistema hematopoiético incluindo os linfócitos autorreativos por quimioterapia e/ou terapia de radiação. Isto, em princípio, constitui uma terapia curativa a doenças autoimunes .

[000292] A mobilização de células de plasma de longa vida, células

B e/ou células T pelo ácido nucleico de acordo com a presente invenção proporciona um método para depleção destas células de um indivíduo. Desse modo, uma quantidade eficaz da molécula de ácido nucleico de acordo com a invenção é administrada a um indivíduo, conduzindo a mobilização de células de plasma de longa vida, células B e/ou células T no sangue periférico do indivíduo. Preferivelmente as células T coletadas são células T de memória. As células podem ser removidas do indivíduo, do sangue periférico do indivíduo respectivamente, por aférese, leucoferese, classificação de célula e/ou citometria de fluxo conforme aqui descrito. Preferivelmente a remoção é feita por citometria de fluxo com marcadores de superfície apropriados para referidas células.

[000293] O método para coleta de células progenitoras e/ou células-tronco e células de plasma de longa vida, células B e/ou células T respectivamente pode ser usado para tratamento e/ou prevenção de doenças autoimunes sistêmicas, doenças autoimunes do trato gastrointestinal, doenças autoimunes da pele, doenças autoimunes da vasculatura, doenças autoimunes do sistema nervoso, doenças autoimunes do esqueleto musculares, e outras doenças autoimunes conforme aqui descrito.

[000294] Nefropatia diabética (abrev. DN) é uma causa proeminente de doença renal de fase final. Embora inibidores de angiotensina possam prevenir a progressão da doença em muitos casos, não existe terapia viável para aquelas que não respondem. Em DN, o tufo glomerular suporta uma baixa, mas progressiva remodelagem estrutural caracterizada por hipertrofia glomerular, acúmulo nodular e difuso de matriz mesanguial extracelular, e dano podócito. O último é pensado contar para a progressão de microalbuminuria em estágios anteriores para publicar proteinuria e glomerulosclerosis nos estágios posteriores de DN. O começo e progressão de DN envolve numerosos

patomecanismos incluindo a deposição de produtos finais de glicosilação avançados, disfunção endotelial, e a expressão local aumentada de fatores de crescimento e mediadores pró-inflamatórios. Geralmente, as quimiocinas pertencem ao último grupo de fatores porque certas quimiocinas promovem inflamação por recrutamento e ativação de células imunes em DN similares em outros tipos de doenças de rim. Por exemplo, anulação alvejada ou bloqueio terapêutico da proteína quimioatratente de monócito MCP-1/CCL2 pode prevenir glomerulosclerose pelo bloqueio de recrutamento de macrófago para glomeruli de macacos com diabetes tipo 1 ou tipo 2 (T1D/T2D) (Chow e outros, 2007; Chow e outros, 2006; Kulkarni e outros, 2007).

[000295] Nada é conhecido a cerca de SDF-1 em DN. DN é desprovida de ou proliferação de podócito ou autoimunidade, consequentemente, os estudos antes mencionados prognosticam duramente o papel funcional predominante de SDF-1 em DN. Contudo, os inventores têm razões para assumir que remodelagem progressiva da estrutura glomerular para glomerulosclerose, uma variante morfológica de cura de ferida, pode envolver sinalização de SDF-1. Baseado nos dados disponíveis de outros estados de doença, parece não-claro se SDF-1 ou predominantemente protege de DN, por exemplo, pela manutenção da integridade do tecido e suportando regeneração, ou se SDF-1 predominantemente promove DN, por exemplo, pelo aumento de glomerulosclerose. Os dados dos inventores usando o ácido nucleico de ligação de SDF-1 NOX-A12-JE40 (SEQ.ID. 132) como uma molécula representativa das moléculas de ácido nucleico de acordo com a presente invenção, em um modelo de camundongo de nefropatia diabética suporta a última, que identifica um novo patomecanismo de glomerulosclerose, e SDF-1 como um alvo terapêutico potencial em DN no Exemplo 12. NOX-A12-JE40

(SEQ.ID. 132) pode, portanto, ser útil como uma terapia para o tratamento ou prevenção de nefropatia diabética. O mecanismo de ação pode potencialmente também ser mediado pela mobilização de células progenitoras e/ou células-tronco derivadas de medula óssea (Ito e outros, 2001). Portanto, os ácidos nucleicos de SDF-1 aqui descrito podem ser usados para fabricação de um medicamento, pelo que o medicamento é para tratamento e/ou prevenção de nefropatia e, preferivelmente, nefropatia diabética.

Hipertensão arterial pulmonar.

[000296] HIPERTENSÃO PULMONAR (abrev. PH) é uma doença séria de etiologia pobremente compreendida caracterizada por pressão arterial pulmonar elevada, conduzindo a falha do coração do lado direito progressiva e, por último, morte. pH resulta de espessamento íntimo de artérias de resistência pulmonar pequena que resultam, pelo menos em parte, de disfunção de célula endotelial e de músculo liso e proliferação. A proliferação de célula endotelial vascular aumentada e muscularização da vasculatura são as características patológicas de remodelagem vascular pulmonar, e tem sido demonstrado que este processo é associado à produção induzida por hipóxia de fatores angiogênicos, mediadores inflamatórios, e vasoconstritores. Yamaji-Kegan e outros. verificaram em um estudo de cultura de órgão de pulmão de camundongo ex vivo que CXCL12/SDF-1 foi regulada ascendentemente e pode ser envolvida no recrutamento intrapulmonar de circulação de células pelo fator mitogênico induzido por hipóxia sobre expressa (abrev. HIMF) (Yamaji-Kegan, Su e outros. 2006). A influência de SDF-1 em remodelagem vascular em geral e em hipertensão arterial pulmonar tem também sido descrito (Schober e Zernecke 2007). Portanto, o bloqueio de SDF-1 por ácidos nucleicos de ligação de SDF conforme aqui descrito pode ser usado para o tratamento e /ou prevenção de hipertensão,

preferivelmente hipertensão pulmonar, mais especificamente hipertensão arterial pulmonar.

Fibrose pulmonar idiopática

[000297] O tecido de pulmão de pacientes com fibrose pulmonar idiopática é descrito para ter números mais altos de células que expressam ambos SDF-1 e CXCR4 do que pulmões normais. Em um modelo de camundongo de fibrose pulmonar induzida por bleomicina, Xu e outros. geraram dados mostrando que a administração de um antagonista de CXCR4 (TN14003) atenua significantemente a fibrose de pulmão. (Xu, Mora e outros. 2007). Portanto, o bloqueio de SDF-1 por ácidos nucleicos de ligação de SDF conforme descrito pode ser usado para o tratamento e /ou prevenção de fibrose pulmonar idiopática.

Fribrose em cura de ferida

[000298] Após dano de queimadura, pele de rato, porco e seres humanos tem se mostrado para expressar SDF-1. Enquanto sendo benéfico durante um curto período de tempo após dano, é acreditado promover a atração de leucócitos (por exemplo, eosinófilos) e fibrose preferivelmente do que promover epitelialização (Avniel, Arik e outros. 2006). Pela inibição de CXCR4 ou SDF-1 por SDF-1 de ligação de ácidos nucleicos conforme aqui descrito, cura de ferida com menos fibrose pode ser obtida.

[000299] Conforme descrito antes, SDF-1 tem sido mostrado estar envolvido na residência de células endoteliais para o coroide durante neovascularização no tecido do olho, pelo que o papel exato destas células está ainda sob investigação (Sengupta, Caballero e outros. 2005). Contudo, os inventores podem mostrar em dois modelos de animal independentes que o bloqueio de SDF-1 por ácido nucleico de ligação de SDF-1 de acordo com a presente invenção conforme aqui descrito conduz a uma redução de neovascularização.

[000300] O modelo de animal de 'neovascularização coroidal induzida por laser' é usado para prognosticar o efeito de fármacos investigacionais em neovasculatura retiniana e coroidal. Isto ocorre em doenças similares a degeneração macular relacionada a idade úmida ou 'proliferativa' (abrev. AMD), retinopatia diabética e oclusão de veia retiniana. CXCR4 foi mostrado ser expresso no CNV induzido por laser (Lima e Silva e outros, FASEB J. 21: , 2007). Ele foi colocalizado com CD45 e F4/80 que expressam células sugerindo que estas células são macrófagos derivados de BM. Inibidores de CXCR4 reduzem CNV induzido por laser. Mas não foi investigado se as células de CXCR4 expressam SDF1 também. Conforme bem-sucedidamente mostrado no Exemplo 11 aqui, o ácido nucleico de ligação de SDF NOX-A12-JE40 (SEQ.ID. 132) como uma molécula de ácido nucleico representativa de acordo com a presente invenção bloqueia neovascularização em um modelo de animal de CNV.

[000301] O modelo de camundongo de retinopatia induzida por oxigênio é um modelo para a imitação de neovascularização induzida por hipóxia da retina, conforme observado em DR, especialmente DR proliferativa, e em AMD (Smith, Wesolowski e outros. 1994). O modelo é também referido como retinopatia de prematuridade, visto que bebês prematuros que foram postos em incubadoras hospitais tornaram-se cegos devido a exposição de oxigênio muito alta nas incubadoras que conduzem a um crescimento de vaso retiniano anormal durante o tempo na incubadora e após seu retorno para condições normóxicas. Conforme descrito no Exemplo 14, no modelo de camundongo, o ácido nucleico de ligação de SDF-1 NOX-A12-JE40 (SEQ.ID. 132) como uma molécula de ácido nucleico representativa de acordo com a presente invenção inibiu significantemente a formação de tufo e, desse modo, aperfeiçoa a contagem de retinopatia total conforme observado no dia P17 conforme aqui revelado.

[000302] Além disso, conforme é mostrado no Exemplo 9, em um ensaio de cultura de órgão de angiogênese-padrão, um ensaio de germinação de anel aórtico, o ácido nucleico de ligação de SDF-1 193-G2-012-5'-PEG (NOX-A12-JE40 (SEQ.ID. 132) como uma molécula de ácido nucleico representativa de acordo com a presente invenção bloqueia germinação induzida de SDF-1.

[000303] Portanto, os ácidos nucleicos de ligação de SDF-1 conforme aqui descritos podem ser usados para fabricação de um medicamento, pelo que o medicamento é para o tratamento de doenças e/ou distúrbios que envolvem angiogênese e/ou neovascularização, preferivelmente neovascularização coroidal. O modelo de animal para neovascularização tem mostrado que ácidos nucleicos de ligação de SDF-1 conforme aqui descrito podem ser usados como um medicamento para o tratamento de doenças e/ou distúrbios que são selecionados do grupo compreendendo doenças retinianas, preferivelmente degeneração macular relacionada à idade, retinopatia diabética, oclusão de veia retiniana, edema macular e edema retiniano.

[000304] Neovascularização é preferivelmente aqui definida como a formação de redes microvasculares funcionais com perfusão de célula de sangue vermelha. Neovascularização difere de angiogênese em que angiogênese é principalmente caracterizada por protrusão e protuberância de origens capilares e germinações de vasos sanguíneos pré-existentes.

Inibição de edema retinino vascular

[000305] No curso de degeneração macular relacionada a idade (AMD), retinopatia diabética e oclusão retiniana vascular, a formação de um edema macular é frequentemente observada. Geralmente, uma permeabilidade aumentada da vasculatura local é a causa da formação de um edema. Frequentemente esta é uma consequência de

processos inflamatórios que mudam a arquitetura vascular ou da formação de neovasculatura avariada imatura.

[000306] A formação de um edema macular pode conduzir a uma rápida deterioração de acuidade visual porque o suprimento retiniano com nutrientes e outras moléculas de sinalização é prejudicado.

[000307] SDF-1 contribui para vários fatores que podem conduzir a formação de um edema. Pela inibição da expressão da proteína de junção estanque ocludina (Butler e outros, 2005), as paredes vasculares podem afrouxarem-se. Ela além disso dispara a invasão de leucócitos que pode criar um ambiente pró-inflamatório e pode estimular a expressão de VEGF (Liang e outros, 2007; Salcedo e outros, 1999), que foi primeiro conhecido como "fator de permeabilidade vascular", visto que sua presença conduz a formação de vasos avariados.

[000308] Não ficou claro se inibição de SDF-1, por exemplo, por ácidos nucleicos de ligação de SDF-1 conforme descrito nesta invenção, conduziria a qualquer efeito fisiológico, visto que SDF-1 é somente expresso em níveis inferiores nos olhos saudáveis (Lima e Silva e outros, 2007).

[000309] Um ácido nucleico de ligação de SDF-1 foi testado em um modelo de coelho de permeabilidade vascular retiniano induzida por VEGF. A permeabilidade que foi observada com fluorometria não foi devido a efeito de ação curta direta da injeção de VEGF intravítrea, mas preferivelmente em cascatas, que são disparados e respondem mais lentamente (Edelman e outros, 2005). O ácido nucleico de ligação de SDF-1 reduz significantemente a permeabilidade vascular retiniano em uma maneira dependente da dose.

Inibição de vasculogênese complementar a ou após falha de inibição de VEGF

[000310] Recentemente, Reddy e outros. mostraram que SDF-1

pode promover crescimento de vaso de tumor mesmo com pouco VEGF presente. Parece ser uma segunda trajetória independente de VEGF para a promoção de neo-vasculatura (Reddy, Zhou e outros. 2008). A interferência com sinalização de SDF-1 por ácidos nucleicos de ligação de SDF-1 tal como os ácidos nucleicos de acordo com a presente invenção pode, portanto, ser benéfica como um tratamento anti-angiogênese. Isto pode ser especialmente vantajoso em não-respondedores anti-VEGF, em pacientes refratários de terapia anti-VEGF, ou em terapia de combinação com fármacos anti-VEGF para todas as indicações que envolvem angiogênese, mais especificamente em doenças retinianas proliferativas, pelo que as doenças retinianas proliferativas são selecionadas de AMD, DR, e oclusão de veia retiniana, e em câncer, preferivelmente tumores sólidos e metástase.

[000311] Fármacos que inibem a função de VEGF incluem, mas não estão limitadas a, Bevacizumab (Avastin), Pegaptanib (Macugen) e Ranibizumab (Lucentis).

[000312] As moléculas de ácido nucleico de SDF-1 aqui reveladas podem ser usadas para fabricação de um medicamento, pelo que o medicamento é para terapia de combinação com um medicamento que inibe VEGF e/ou para uso em indivíduos que respondem fracamente ou não responde a terapia com um medicamento de inibição de VEGF. Fracamente conforme aqui usado em conjunto com reposta a qualquer terapia em conjunto com qualquer aspecto e concretização do presente pedido, significa neste contexto que nenhuma remissão da doença é alcançada.

Síndrome de WHIM

[000313] A síndrome de WHIM é uma deficácia imune que é frequentemente caracterizada por uma forma truncada do receptor de CXCR4. Isto conduz a uma sensitização aumentada para o ligante de receptor de SDF-1 (CXCL-12) e, desse modo, para quimiotaxia mais

forte. Portanto, de modo a alcançar célula-tronco normal, O tráfego é benéfico para abaixar a concentração de SDF-1 biologicamente ativa no corpo com um agente de bloqueio de SDF-1 similar a uma Molécula de ligação de SDF-1 de ácido nucleico de acordo com a presente invenção, ou para usar um bloqueador de receptor de CXCR4 (Lagane, Chow e outros. 2008).

[000314] A separação e/ou depleção de células similares a células progenitoras e/ ou células-tronco, células de plasma de longa vida, células B de memória e/ou células T de memória do corpo, preferivelmente do sangue, pode ser feita por aférese, classificação de célula e citometria de fluxo.

[000315] Aférese é uma tecnologia em que o sangue de um indivíduo é passado através de um aparelho que separa um constituinte particular ou grupo de constituintes e retornam o restante para a circulação. Dependendo das substâncias e/células a serem removidas, processos diferentes foram empregados em aférese incluindo coleta de célula-tronco, procedimentos de absorção e cromatografia de afinidade.

[000316] Leucoférese é um procedimento de laboratório em que células de sangue brancas são separadas de uma amostra de sangue. Isto pode ser feito para diminuir uma contagem de célula de sangue muito alta em indivíduos com câncer (leucemia), ou para remover células de sangue brancas para transfusão.

[000317] Classificação de célula é um processo pelo que populações misturadas de células separadas em duas ou mais populações como exemplarmente mostrado para citometria de fluxo, preferivelmente Classificação de célula Ativada por Fluorescência (FACS) e Classificação de célula Ativada Magnética (FACS).

[000318] Citometria de fluxo é uma técnica para contagem, exame, e classificação de partículas microscópicas similares a populações

diferentes de células suspensas em uma corrente de fluido. Ela permite análise multiparamétrica simultânea das características físicas e químicas de células simples escoando através de um aparelho de detecção ótico e/ou eletrônico. Classificação de célula ativada por fluorescência é um tipo especializado de citometria de fluxo. Ela proporciona um método para classificação de uma mistura heterogênea de células biológicas em dois ou mais recipientes, uma célula em um tempo, baseada na difusão de luz específica e características fluorescentes de cada célula. Marcação fluorescente de uma partícula/célula pode ser feito por incubação das partículas/células com um corante fluorescente que se liga a partícula/célula. Ele é um instrumento científico útil, visto que proporciona registro rápido, objetivo e quantitativo de sinais fluorescentes de células individuais, bem como separação física de células de interesse particular. O acrônimo FACS é marca registrada e de propriedade de Becton Dickinson. Classificação de célula ativada magnética (MACS) é um nome comercial registrado por Miltenyi Biotec para um método para separação de várias populações de célula em seus antígenos superficiais (moléculas de CD). Desse modo a mistura de células a serem separadas é incubada com esferas magnéticas revestidas com anticorpos contra um antígeno de superfície particular. Isto faz com que as células que expressam este antígeno fixem-se às esferas magnéticas. Em seguida a solução de célula é transferida em uma coluna colocada em um campo magnético forte. Nesta etapa, as células fixadas às esferas (expressando o antígeno) ficam na coluna, enquanto outras células (não expressando o antígeno) escoam. Com este método, as células podem ser separadas positivamente ou negativamente com relação ao(s) antígeno(s) particular(es).

[000319] Em uma concretização adicional, o medicamento compreende um agente farmaceuticamente ativo adicional. Tais

compostos farmaceuticamente ativos adicionais podem ser aqueles conhecidos ao versado na técnica, e são preferivelmente selecionados do grupo compreendendo quimiocina ou antagonistas de citocina, corticosteroides, e similares. Será compreendido por um versado na técnica que dadas as várias indicações que podem ser determinadas de acordo com a presente invenção pelos ácidos nucleicos de acordo com a presente invenção, referido agente farmaceuticamente ativo adicional pode ser qualquer um que em princípio é adequado para o tratamento e/ou prevenção de tais doenças. As moléculas de ácido nucleico de acordo com a presente invenção, particularmente se presentes ou usadas como um medicamento, são preferivelmente combinadas com fator de estimulação de granulócito-macrófago (GM-CSF), Interleucin-1 (IL-1), Interleucin-3 (IL-3), Interleucin-8 (IL-8), PIXY-321 (proteína de fusão GM-CSF/IL-3), proteína inflamatória de macrófago (MIP), fator de célula-tronco, trombopoietina e oncogene relacionada a crescimento, como agentes simples ou em combinação.

[000320] Alternativamente, ou adicionalmente, tal agente farmaceuticamente ativo adicional é um ácido nucleico adicional de acordo com a presente invenção. Alternativamente, o medicamento compreende pelo menos um mais ácido nucleico que se liga a uma molécula-alvo diferente de SDF-1, ou exibe uma função que é diferente do um dos ácidos nucleicos de acordo com a presente invenção.

[000321] Conforme será compreendido pelos versados na técnica, os ácidos nucleicos da invenção podem efetivamente serem usados em qualquer doença onde um antagonista a SDF-1 pode ser administrado a um paciente em necessidade de tal antagonista e tal antagonista é adequado para eliminar a causa da doença ou do distúrbio ou pelo menos reduzir os efeitos da doença ou do distúrbio. Tal efeito inclui, mas não é limitado a neovascularização patológica, inflamação e

metástase. A aplicabilidade dos ácidos nucleicos de acordo com a presente invenção em conjunto com estas e outras doenças ou distúrbios resulta, entre outros, do envolvimento de SDF-1 conforme esboçado na parte introdutória do presente relatório descritivo que é incorporado aqui por referência de modo a evitar qualquer repetição desnecessária.

[000322] Em uma concretização do medicamento da presente invenção, tal medicamento é para uso em combinação com outros tratamentos para qualquer das doenças aqui descritos, particularmente aquelas para que o medicamento da presente invenção é para ser usado.

[000323] "Terapia de combinação" (ou "coterapia") inclui a administração de um medicamento da invenção e pelo menos um segundo agente como parte de um regime específico de tratamento pretendido para proporcionar o efeito benéfico da coação destes agentes terapêuticos, isto é, o medicamento da presente invenção e o referido segundo agente. O efeito benéfico da combinação inclui, mas não é limitado a co-ação farmacocinética ou farmacodinâmica, resultante da combinação de agentes terapêuticos. A administração destes agentes terapêuticos em combinação tipicamente é efetuada sobre um período de tempo definido (usualmente minutos, horas, dias ou semanas dependendo da combinação selecionada).

[000324] "Terapia de combinação" pode, mas geralmente não é, pretendida para envolver a administração de dois ou mais destes agentes terapêuticos como parte de regimes de monoterapia separados que incidentalmente e arbitrariamente resultam nas combinações da presente invenção. "Terapia de combinação" é pretendida envolver administração destes agentes terapêuticos em uma maneira sequencial, isto é, no qual cada agente terapêutico é administrado em um tempo diferente, bem como administração destes

agentes terapêuticos, ou pelo menos dois dos agentes terapêuticos, em uma maneira substancialmente simultânea. Administração substancialmente simultânea pode ser acompanhada, por exemplo, por administração a um indivíduo de uma cápsula simples tendo uma proporção fixa de cada agente terapêutico ou em cápsulas simples múltiplas para cada um dos agentes terapêuticos.

[000325] Administração sequencial ou substancialmente simultânea de cada agente terapêutico pode ser efetuada por qualquer rota apropriada incluindo, mas não-limitada a vias tópicas, vias orais, vias intravenosas, vias intramusculares, e absorção direta através dos tecidos da membrana da mucosa. Os agentes terapêuticos podem ser administrados pela mesma rota ou por rotas diferentes. Por exemplo, um primeiro agente terapêutico da combinação selecionada pode ser administrado por injeção, enquanto os outros agentes terapêuticos da combinação podem ser administrados topicamente.

[000326] Alternativamente, por exemplo, todos os agentes terapêuticos podem ser administrados topicamente ou todos os agentes terapêuticos podem ser administrados por injeção. A sequência em que os agentes terapêuticos são administrados não é estreitamente crítica, a menos que de outro modo notado. "Terapia de combinação" também pode envolver a administração dos agentes terapêuticos conforme descrito acima em combinação adicional com outros ingredientes biologicamente ativos. Onde a terapia de combinação compreende adicionalmente um tratamento em fármaco, o tratamento sem fármaco pode ser conduzido a qualquer tempo adequado considerando que um efeito benéfico da coação da combinação dos agentes terapêuticos e tratamento sem fármaco é alcançado. Por exemplo, em casos apropriados, o efeito benéfico é ainda alcançado quando o tratamento sem fármaco é temporariamente removido da administração dos agentes terapêuticos, talvez por dias

ou mesmo semanas.

[000327] Conforme esboçado em termos gerais acima, o medicamento de acordo com a presente invenção pode ser administrado, em princípio, em qualquer forma conhecida aos versados na técnica. Uma rota preferida de administração é administração sistêmica, mais preferivelmente por administração parenteral, preferivelmente por injeção. Alternativamente, o medicamento pode ser administrado localmente. Outras rotas de administração compreendem intramuscular, intraperitoneal, e subcutânea, por oral, intranasal, intratraqueal ou pulmonar, com preferência dada a rota de administração que é a menos invasiva, enquanto assegura eficácia.

[000328] Administração parenteral é geralmente usada para injeções subcutânea, intramuscular ou intravenosa e infusões. Adicionalmente, uma aproximação para administração parenteral emprega a implantação de sistemas de liberação lenta ou de liberação sustentada, que asseguram que um nível constante de dosagem seja mantido, que são bem-conhecidos ao versado na técnica.

[000329] Adicionalmente, medicamentos preferidos da presente invenção podem ser administrados na forma intranasal via uso tópico de veículos intranasais adequados, inalantes, ou via rotas transdermais, usando aquelas formas de emplastros de pele transdermais bem-conhecidos àqueles versados na técnica. Para ser administrado na forma de um sistema de distribuição transdermal, a administração de dosagem será, naturalmente, contínua preferivelmente do que intermitente através de todo o regime de dosagem. Outras preparações tópicas preferidas incluem cremes, unguentos, loções, sprays aerosol e géis, no qual a concentração de ingrediente ativo variaria tipicamente de 0,01% a 15%, p/p ou p/v.

[000330] Em adição a administração direta ao indivíduo, os

medicamentos preferidos da presente invenção podem ser usados em protocolos de tratamento ex vivo para preparar culturas de célula que são então usadas para reabastecer as células de sangue do indivíduo. Tratamento ex vivo pode ser conduzido em células autólogas coletadas do sangue periférico ou medula óssea ou de aloenxertos de doadores equiparados. A concentração de medicamentos preferidos da presente invenção, ou em combinação com outros agentes, tal como proteína inflamatória de macrófago, está dentro dos versados na técnica.

[000331] Indivíduos que responderão favoravelmente ao método da invenção incluem indivíduos médicos e veterinários geralmente, incluindo seres humanos e pacientes humanos. Entre outros indivíduos para que os métodos e meios da invenção são úteis estão gatos, cães, animais grandes, aves tais como galinhas, e similares. Em geral, qualquer indivíduo que se beneficiaria de uma elevação de células progenitoras e/ou células-tronco, ou cujas células progenitoras e/ou células-tronco são desejáveis para transplante de célula-tronco são apropriados para administração do método da invenção.

[000332] Condições típicas que podem ser melhoradas ou, de outro modo, beneficiadas pelo método e os meios da invenção incluem distúrbios hematopoiéticos, tais como anemia aplástica, leucemias, anemia induzida por fármacos, e déficits hematopoiéticos de quimioterapia ou terapia de radiação. O método e o meio da invenção são também úteis no aumento do sucesso de transplante durante e em seguida a tratamentos imunosupressivos, bem como na efetuação de cura de ferida mais eficaz e tratamento de inflamação bacterial. O método da presente invenção é adicionalmente útil para tratamento de indivíduos que são imunocomprometidos, ou cujo sistema imune está, de outro modo, prejudicado. Condições típicas que são melhoradas ou, de outro modo, beneficiadas pelo método da presente invenção,

incluem aqueles indivíduos que são infectados com um retrovírus e, mais especificamente, que são infectados com vírus da imunodeficácia humana (HIV). O método da invenção, desse modo, tem como alvo um espectro amplo de condições para que elevação de células progenitoras e/ou células-tronco em um indivíduo seria benéfica ou, onde coleta de células progenitoras e/ou célula-tronco para transplante de célula-tronco subsequente seria benéfico.

[000333] O ácido nucleico da presente invenção é, em uma concretização, também administrado para regenerar miocárdio por mobilização de células-tronco de medula óssea.

[000334] O medicamento da presente invenção compreenderá geralmente uma quantidade eficaz do(s) componente(s) ativo(s) da terapia, incluindo, mas não-limitado a, uma molécula de ácido nucleico da presente invenção, dissolvida ou dispersa em um meio farmaceuticamente aceitável. Meio farmaceuticamente aceitável ou veículos incluem qualquer e todos os solventes, meio de dispersão, revestimentos, agentes antibacterial e antifungal, isotônico, e agentes de retardamento de absorção, e similares. O uso de tal meio e agentes para substâncias farmacêuticas ativas é bem-conhecido na técnica. Ingredientes ativos suplementares podem também serem incorporados no medicamento da presente invenção.

[000335] Em um aspecto adicional, a presente invenção está relacionada a uma composição farmacêutica. Tal composição farmacêutica compreende pelo menos um dos ácidos nucleicos de acordo com a presente invenção e, preferivelmente, um ligante farmaceuticamente ativo. Tal ligante pode ser qualquer ligante usado e/ou conhecido na técnica. Mais particularmente, tal ligante é qualquer ligante conforme discutido em conjunto com a fabricação do medicamento aqui descrito. Em uma outra concretização, a composição farmacêutica compreende um outro agente

farmaceuticamente ativo.

[000336] A preparação de um medicamento e de uma composição farmacêutica será conhecida àquele versado na técnica à luz da presente descrição. Tipicamente, tais composições podem ser preparadas como injetáveis, ou como soluções líquidas ou suspensões; formas sólidas adequadas para solução em, ou suspensão em líquido antes da injeção; como comprimidos ou outros sólidos para administração oral; como cápsulas de liberação de tempo; ou em qualquer outra forma correntemente usada, incluindo gotas no olho, cremes, loções, pomadas, inalantes, e similares. O uso de formulações estéreis, tais como lavagens baseadas em salina, por cirurgiões, médicos ou operadores de cuidado de saúde para tratar uma área particular no campo de operação pode também ser particularmente útil. Composições podem também serem distribuídas via microdispositivo, micropartícula ou esponja.

[000337] Após formulação, um medicamento será administrado em uma maneira compatível com a formulação de dosagem, e em tal quantidade conforme é farmacologicamente eficaz. As formulações são facilmente administradas em uma variedade de formas de dosagem, tal como o tipo de soluções injetáveis descrito acima, mas cápsulas de liberação de fármaco e similares podem também serem empregadas.

[000338] Neste contexto, a quantidade de ingrediente ativo e volume de composição a ser administrado dependem do indivíduo ou do objetivo a ser tratado. Quantidades específicas de composto ativo requeridas para administração dependem do julgamento do médico e são peculiares a cada indivíduo.

[000339] Um volume mínimo de um medicamento requerido para dispersar os compostos ativos é tipicamente utilizado. Regime adequados para administração são também variáveis, mas seriam

tipificados por administração inicial do composto e monitoramento dos resultados e então dando-se doses adicionais controladas em intervalos adicionais.

[000340] Por exemplo, para administração oral na forma de um comprimido ou cápsula (por exemplo, uma cápsula de gelatina), o componente de fármaco ativa, isto é, uma molécula de ácido nucleico da presente invenção e/ou qualquer outro agente farmaceuticamente ativo, também referido aqui como agente(s) terapêutico(s) ou composto(s) ativo(s) podem ser combinados com um veículo inerte farmaceuticamente aceitável oral, não-tóxico, tal como etanol, glicerol, água, e similares. Além disso, quando desejado ou necessário, ligantes adequados, lubrificantes, agentes de desintegração, e agentes colorantes podem também serem incorporados na mistura. Ligantes adequados incluem amido, silicato de magnésio alumínio, pasta de amido, gelatina, metilcelulose, sódio carboximetilcelulose e/ou polivinilpirrolidona, açúcares naturais tais como glicose ou beta-lactose, adoçantes de milho, gomas naturais e sintéticas tais como acácia, tragacanth ou alginato de sódio, polietileno glicol, ceras, e similares. Lubrificantes usados nestas formas de dosagem incluem oleato de sódio, estearato de sódio, estearato de magnésio, benzoato de sódio, acetato de sódio, cloreto de sódio, sílica, talco, ácido esteárico, seu sal de magnésio ou de cálcio e/ou polietilenoglicol, e similares. Desintegradores incluem, sem limitação, amido, metil celulose, agar, bentonita, amidos de goma xantano, agar, ácido algínico ou seu sal de sódio, ou misturas efervescentes, e similares. Diluentes, incluem, por exemplo, lactose, dextrose, sucrose, manitol, sorbitol, celulose e/ou glicina.

[000341] O medicamento da invenção pode também ser administrado em tais formas de dosagem oral como comprimidos ou cápsulas de liberação regulada e liberação sustentada, pílulas, pós,

grânulos, elixires, tinturas, suspensões, xaropes e emulsões. Supositórios são vantajosamente preparados de emulsões graxas ou suspensões.

[000342] A composição farmacêutica ou medicamento pode ser esterilizada e/ou conter adjuvantes, tais como agentes de conservação, agentes de estabilização, agentes de umedecimento ou de emulsão, promotores de solução, sais para regular a pressão osmótica e/ou tampões. Em adição, eles podem também conter outras substâncias terapeuticamente valiosas. As composições são preparadas de acordo com métodos de mistura convencional, granulação, ou revestimento, e tipicamente contêm cerca de 0,1% a 75%, preferivelmente cerca de 1% a 50%, do ingrediente ativo.

[000343] Composições particularmente injetáveis, líquidas, podem, por exemplo, serem preparadas por dissolução, dispersão, etc. O composto ativo é dissolvido em ou misturado com um solvente farmaceuticamente puro tal como, por exemplo, água, salina, dextrose aquosa, glicerol, etanol, e similares, para, desse modo, formar a solução injetável ou suspensão. Adicionalmente, formas sólidas adequadas para dissolução em líquido antes da injeção podem ser formuladas.

[000344] Para composições sólidas, excipientes incluem graus farmacêuticos de manitol, lactose, amido, estearato de magnésio, sacarina de sódio, talco, celulose, glicose, sacarose, carbonato de magnésio, e similares. O composto ativo acima definido pode ser também formulado como supositórios, usando, por exemplo, polialquileno glicóis, por exemplo, propileno glicol, como o veículo. Em algumas concretizações, supositórios são vantajosamente preparados de emulsões graxas ou suspensões.

[000345] Os medicamentos e moléculas de ácido nucleico, respectivamente, da presente invenção podem também serem

administrados na forma de sistemas de distribuição de lipossoma, tais como vesículas unilamelares pequenas, vesículas unilamelares grandes e vesículas multilamelares. Lipossomas podem ser formados de uma variedade de fosfolipídeos, contendo colesterol, estearilamina ou fosfatidilcolinas. Em algumas concretizações, um filme de componentes de lipídeo é hidratado com uma solução aquosa de fármaco para formar uma camada de lipídeo que encapsula a fármaco, o que é bem-conhecido a um versado na técnica. Por exemplo, as moléculas de ácido nucleico aqui descritas pode ser provida como um complexo com um composto lipofílico ou não-imunogênico, composto de alto peso molecular construído usando métodos conhecidos na técnica. Adicionalmente, os lipossomas podem ser tais moléculas de ácido nucleico em sua superfície para direcionar e conduzir agentes citotóxicos internamente para mediar morte de célula. Um exemplo de complexos associados a ácido nucleico é provido na Patente US Nº 6.011.020.

[000346] Os medicamentos e moléculas de ácido nucleico, respectivamente, da presente invenção podem também serem acoplados com polímero solúveis como veículos de fármaco direcionáveis. Tais polímeros podem incluir polivinilpirrolidona, copolímero de piran, poli-hidroxipropil-metacrilamida-fenol, poli-hidroxietilaspanamidefenol, ou polietileno-oxidepolilisina substituída com resíduos de palmitol. Além disso, os medicamentos e moléculas de ácido nucleico, respectivamente, da presente invenção, podem ser acoplados a uma classe de polímeros biodegradáveis úteis no alcance de liberação controlada de um fármaco, por exemplo, ácido polilático, poliepsilon capro lactona, poli-hidróxi ácido butírico, poliortoésteres, poliacetais, poli-di-hidropirans, policianoacrilatos e copolímeros de bloco reticulados ou anfipáticos de hidrogéis.

[000347] Se desejado, a composição farmacêutica e medicamento,

respectivamente, a serem administrados podem também conter quantidade menores de substâncias auxiliares não-tóxicas tais como agentes de umedecimento ou de emulsificação, agentes de tamponamento de pH, e outras substâncias tais como, por exemplo, acetato de sódio, e oleato de trietanolamina.

[000348] O regime de dosagem utilizando as moléculas de ácido nucleico e medicamentos, respectivamente, da presente invenção, é selecionado de acordo com uma variedade de fatores incluindo tipo, espécie, idade, peso, sexo e condição médica do paciente; a severidade da condição a ser tratada; a rota de administração; a função renal e hepática do paciente; e o aptâmero particular ou sal do mesmo empregado. Um médico versado na técnica ou veterinário pode prontamente determinar e prescrever a quantidade eficaz do fármaco requerida para prevenir, contar ou controlar o progresso da condição.

[000349] Níveis de plasma eficazes do ácido nucleico de acordo com a presente invenção preferivelmente variam de 500 fM a 500 μM no tratamento de qualquer da doenças aqui descritas.

[000350] As moléculas de ácido nucleico e medicamentos, respectivamente, da presente invenção, podem preferivelmente ser administrados em uma dose diária simples, todo segundo ou terceiro dia, semanalmente, toda segunda semana, em uma dose mensal simples, ou todo terceiro mês.

[000351] Está dentro da presente invenção que o medicamento conforme aqui descrito constitui a composição farmacêutica aqui descrita.

[000352] Em um aspecto adicional, a presente invenção está relacionada a um método para o tratamento de um indivíduo que está em necessidade de tal tratamento, pelo que o método compreende a administração de uma quantidade farmaceuticamente ativa de pelo

menos um dos ácidos nucleicos de acordo com a presente invenção. Em uma concretização, o indivíduo que sofre de uma doença ou está em risco de desenvolver tal doença, pelo que a doença é qualquer daquelas aqui descritas, particularmente qualquer daquelas doenças descritas em conjunto com o uso de qualquer dos ácidos nucleicos de acordo com a presente invenção para a fabricação de um medicamento.

[000353] Conforme preferivelmente usado aqui, o termo tratamento compreende em uma concretização referida adicionalmente ou alternativamente prevenção e/ou reforço.

[000354] Conforme preferivelmente usado aqui, os termos doença e distúrbio devem ser usados em uma maneira permutável, se não indicado ao contrário.

[000355] Conforme aqui usado, o termo compreende é preferivelmente não pretendido para limitar o assunto em questão seguida ou descrita por tal termo. Contudo, em uma concretização alternativa, o termo compreende deve ser compreendido no significado de conter e, desse modo, como limitando o assunto em questão seguida ou descrita por tal termo.

[000356] As várias SEQ.ID.Nos., a natureza química das moléculas de ácido nucleico de acordo com a presente invenção, e as moléculas-alvos de SDF-1 conforme aqui usadas, a sequência atual destas, e o número de referência interna na tabela seguinte.

[000357] Tem que ser observado que os ácidos nucleicos foram caracterizados no aptâmero, isto é, nível de D-ácido nucleico (D-RNA) com a D-SDF-1 biotinilatada humana (SEQ.ID. 4), ou no nível Spiegelmer, isto é, L-ácido nucleico (L-RNA) com a configuração natural de SDF-1, a L- SDF-1 (SDF-1 α humana, SEQ-ID. 1). Os ácidos nucleicos diferentes compartilham um nome de referência interna, mas uma SEQ.ID para a molécula de D-RNA (Aptâmero) e

uma SEQ.ID. para a molécula de L-RNA (Spiegelmer), respectivamente.

TABELA 1 (A)

Seq.-ID	RNA/Peptídeo	Sequência	Referência interna
1	L-peptídeo	KPVSLSYRCPCRFFESHVARANVKHLKILNTPNCALQIVARLKNN NRQVCIDPKLKWIQEYLEKALNK	ser humano/macado/gato SDF-la ser humano/macado/gato SDF-1
2	L-peptídeo	KPVSLSYRCPCRFFESHVARANVKHLKILNTPNCALQIVARLKNN NRQVCIDPKLKWIQEYLEKALNKRFKM	ser humano/macado/gato SDF-ip
3	L-peptídeo	KPVSLSYRCPCRFFESHIARANVKHLKILNTPNCALQIVARLKNN NRQVCIDPKLKWIQEYLEKALNK	murina SDF-lα murina SDF-1
4	D-peptídeo	KPVSLSYRCPCRFFESHVARANVKHLKILNTPNCALQIVARLKNN NRQYCIDPKLKWIQEYLEKALNKRFK-Biotin	D-SDF-1 hu biotinilatada
5	L-RNA (SPIEGELMER)	GCUGUGAAAGCAACAUGUCAAUGAAAGGUAGCCGCAGC	192-A10-001
6	L-RNA (SPIEGELMER)	GCUGUGAAAGUAACAUGUCAAUGAAAGGUAACCACAGC	192-G10
7	L-RNA (SPIEGELMER)	GCUGUGAAAGUAACACGUCAAUGAAAGGUAACCGCAGC	192-F10
8	L-RNA (SPIEGELMER)	GCUGUGAAAGUAACACGUCAAUGAAAGGUAACCACAGC	192-B11
9	L-RNA (SPIEGELMER)	GCUGUAAAAGUAACAUGUCAAUGAAAGGUAACUACAGC	192-C9
10	L-RNA (SPIEGELMER)	GCUGUAAAAGUAACAAGUCAAUGAAAGGUAACUACAGC	192-E10
11	L-RNA (SPIEGELMER)	GCUGUGAAAGUAACAAGUCAAUGAAAGGUAACCACAGC	192-C10
12	L-RNA (SPIEGELMER)	GCAGUGAAAGUAACAU GU CAAU GAAAGGUAAC CACAGC	192-D11
13	L-RNA (SPIEGELMER)	GCUGUGAAAGUAACAUGUCAAUGAAAGGUAACCACUGC	192-G11
14	L-RNA (SPIEGELMER)	GCUAUGAAAGUAACAUGUCAAUGAAAGGUAACCAUAGC	192-H11

TABELA 1 (B)

Seq.-ID	RNA/Peptídeo	Sequência	Referência interna
15	L-RNA (SPIEGELMER)	GCUGCGAAAGCGACAUGUCAAUGAAAGGUAGCCGCAGC	192-D10
16	L-RNA (SPIEGELMER)	GCUGUGAAAGCAACAUGUCAAUGAAAGGUAGCCACAGC	192-E9
17	L-RNA (SPIEGELMER)	GCUGUGAAAGUAACAUGUCAAUGAAAGGUAGCCGCAGC	192-H9
18	L-RNA (SPIEGELMER)	AGCGUGAAAGUAACACGUAAAAUGAAAGGUAACCACGCU	191-A6
19	L-RNA (SPIEGELMER)	AAAGYRACAHGUMAAX$_A$UGAAAGGUARC; X$_A$ = A ou ausente	Tipo A Fórmula-1
20	L-RNA (SPIEGELMER)	AAAGYRACAHGUMAAUGAAAGGUARC	Tipo A Fórmula-2
21	L-RNA (SPIEGELMERj	AAAGYRACAHGUMAAAUGAAAGGUARC	Tipo A Fórmula-3
22	L-RNA (SPIEGELMER)	AAAGYAACAHGUCAAUGAAAGGUARC	Tipo A Fórmula-4
23	L-RNA (SPIEGELMER	RSHRYR	Tipo A Fórmula-5-5'
24	L-RNA (SPIEGELMER	YRYDSY	Tipo A Fórmula-5-3'
25	L-RNA (SPIEGELMER)	CUGUGAAAGCAACAUGUCAAUGAAAGGUAGCCGCAG	192-A10-002
26	L-RNA (SPIEGELMER)	UGUGAAAGCAACAUGUCAAUGAAAGGUAGCCGCA	192-A10-003
27	L-RNA (SPIEGELMER)	GUGAAAGCAACAUGUCAAUGAAAGGUAGCCGC	192-A10-004
28	L-RNA (SPIEGELMER)	UGAAAGCAACAUGUCAAUGAAAGGUAGCCG	192-A10-005
29	L-RNA (SPIEGELMER)	GAAAGCAACAUGUCAAUGAAAGGUAGCC	192-A10-006
30 L-RNA (SPIEGELMER)		AAAGCAACAUGUCAAUGAAAGGUAGC	192-A10-007

TABELA 1 (C)

Seq.-ID	RNA/Peptídeo	Sequência	Referência interna
31	L-RNA (SPIEGELMER)	GCGUGAAAGCAACAUGUCAAUGAAAGGUAGCCGCGC	192-A10-008
32	L-RNA (SPIEGELMER)	GCGCGAAAGCAACAUGUCAAUGAAAGGUAGCCGCGC	192-A10-015
33	L-RNA (SPIEGELMER)	GCGGAAAGCAACAUGUCAAUGAAAGGUAGCCCGC	192-A10-014
34	L-RNA (SPIEGELMER)	CGUGAAAGCAACAUGUCAAUGAAAGGUAGCCGCG	192-A10-016
35	L-RNA (SPIEGELMER)	GCGCAAAGCAACAUGUCAAUGAAAGGUAGCGUGC	192-A10-017
36	L-RNA (SPIEGELMER)	GUGCAAAGCAACAUGUCAAUGAAAGGUAGCGCGC	192-A10-018
37	L-RNA (SPIEGELMER)	CGCGAAAGCAACAUGUCAAUGAAAGGUAGCCGUG	192-A10-019
38	L-RNA (SPIEGELMER)	GGGCAAAGCAACAUGUCAAUGAAAGGUAGCGCCC	192-A10-020
39	L-RNA (SPIEGELMER)	GGCCAAAGCAACAUGUCAAUGAAAGGUAGCGGCC	192-A10-021
40	L-RNA (SPIEGELMER)	GCCCAAAGCAACAUGUCAAUGAAAGGUAGCGGGC	192-A10-022
41	L-RNA (SPIEGELMER)	CCCCAAAGCAACAUGUCAAUGAAAGGUAGCGGGG	192-A10-023
42	L-RNA (SPIEGELMER)	X_2BBBS; X2 = S ou ausente	Tipo A Fórmula-6-5'
43	L-RNA (SPIEGELMER)	SBBVX_3; X_3 = S ou ausente	Tipo A Fórmula-6-3'
44	L-RNA (SPIEGELMER)	XiX_2NNBV; Xi = R ou ausente, X_2 = S ou ausente	Tipo A Fórmula-7-5'
45	L-RNA (SPIEGELMER)	BNBNX_3X_4; X_3 = R ou ausente, X, = Y ou ausente	Tipo A Fórmula-7-3'
46	L-RNA (SPIEGELMER)	AGCGUGGUGUGAUCUAGAUGUAGUGGCUGAUCCUAGUCAGGUACGCU	193-C2-001
47	L-RNA (SPIEGELMER)	AGCGUGGUGUGAUCUAGAUGUAUUGGCUGAUCCUAGUCAGGUACGCU	193-G2-001

TABELA 1 D

Seq.-ID	RNA/Peptídeo	Sequência	Referência interna
48	L-RNA (SPIEGELMER)	AGCGUGGUGUGAUCUAGAUGUAAUGGCUGAUCCUAGUCAGGUGCGCU	193-F2-001
49	L-RNA (SPIEGELMER)	GCGAGGUGUGAUCUAGAUGUAGUGGCUGAUCCUAGUCAGGUGCGC	193-G1-002
50	L-RNA (SPIEGELMER)	GCGOGGUGUGAUCUAGAUGUAGUGGCUGAUCCUAGUCAGGUGCGC	193-D2-002
51	L-RNA (SPIEGELMER)	GCAUGGUGUGAUCUAGAUGUAGUGGCUGAUCCUAGUCAGGUGCCC	193-A1-002
52	L-RNA (SPIEGELMER)	GCGUGGUGUGAUCUAGAUGUAAUGGCUGAUCCUAGUCAGGGACGC	193-D3-002
53	L-RNA (SPIEGELMER)	GCGUGGUGUGAUCUAGAUGUAGAGGCUGAUCCUAGUCAGGUACGC	193-B3-002
54	L-RNA (SPIEGELMER)	GCGUGGUGUGAUCUAGAUGUAAAGGCUGAUCCUAGUCAGGUACGC	193-H3-002
55	L-RNA (SPIEGELMER)	GCGUGGUGUGAUCUAGAUGUAGUGGCUGUUCCUAGUCAGGUAUGC	193-E3-002
56	L-RNA (SPIEGELMER)	GCGUGGUGUGAUCUAGAUGUAGUGGCUGAUCCUAGUUAGGUACGC	193-D1-002
57	L-RNA (SPIEGELMER)	GUGUGAUCUAGAUGUADWGGCUGWUCCUAGUYAGG	Tipo B Fórmula-1
58	L-RNA (SPIEGELMER)	GUGUGAUCUAGAUGUADUGGCUGAUCCUAGUCAGG	Tipo B Fórmula-2
59	L-RNA (SPIEGELMER)	XiGCRWG; X_1 = A ou ausente	Tipo B Fórmula-3-5'
60	L-RNA (SPIEGELMER)	KRYSCX_4; X_4 = U ou ausente	Tipo B Fórmula-3-3'
61	L-RNA (SPIEGELMER)	GCGUGGUGUGAUCUAGAUGUAGUGGCUGAUCCUAGUCAGGUACGC	193-C2-002
62	L-RNA (SPIEGELMER)	CGUGGUGUGAUCUAGAUGUAGUGGCUGAUCCUAGUCAGGUACG	193-C2-003

TABELA 1 (E)

Seq.-ID	RNA/Peptídeo	Sequência	Referência interna
63	L-RNA (SPIEGELMER)	GUGGUGUGAUCUAGAUGUAGUGGCUGAUCCUAGUCAGGUAC	193-C2-004
64	L-RNA (SPIEGELMER)	UGGUGUGAUCUAGAUGUAGUGGCUGAUCCUAGUCAGGUA	193-C2-005
65	L-RNA (SPIEGELMER)	GGUGUGAUCUAGAUGUAGUGGCUGAUCCUAGUCAGGU	193-C2-006
66	L-RNA (SPIEGELMER)	GUGUGAUCUAGAUGUAGUGGCUGAUCCUAGUCAGG	193-C2-007
67	L-RNA (SPIEGELMER)	GCGUGGUGUGAUCUAGAUGUAUUGGCUGAUCCUAGUCAGGUACGC	193-G2-012
68	L-RNA (SPIEGELMER)	GCGCGGUGUGAUCUAGAUGUAUUGGCUGAUCCUAGUCAGGCGCGC	193-G2-013
69	L-RNA (SPIEGELMER)	GCGCGUGUGAUCUAGAUGUAUUGGCUGAUCCUAGUCAGGGCGC	193-G2-014
70	L-RNA (SPIEGELMER)	GGGCGUGUGAUCUAGAUGUAUUGGCUGAUCCUAGUCAGGGCCC	193-G2-015
71	L-RNA (SPIEGELMER)	GGCCGUGUGAUCUAGAUGUAUUGGCUGAUCCUAGUCAGGGGCC	193-G2-016
72	L-RNA (SPIEGELMER)	GCCCGUGUGAUCUAGAUGUAUUGGCUGAUCCUAGUCAGGGGGC	193-G2-017
73	L-RNA (SPIEGELMER)	X_2SSBS; X_2 = G ou ausente	Tipo B Fórmula-4-5'
74	L-RNA (SPIEGELMER)	BVSSX_3; X_3 = C ou ausente	Tipo B Fórmula-4-3'
75	L-RNA (SPIEGELMER)	XiGCGUG; X_1 = A ou ausente	Tipo B Fórmula-5-5'
76	L-RNA (SPIEGELMER)	UACGCX_4; X_4 = U ou ausente	Tipo B Fórmula-5-3'
77	L-RNA (SPIEGELMER)	XiX_2SVNS; X_1 = A ou ausente, X_2 = G ou ausente	Tipo B Fórmula-6-5'
78	L-RNA (SPIEGELMER)	BVBSX3X4; X_3 = C ou ausente, X_4 = U ou ausente	Tipo B Fórmula-6-3'

TABELA 1 F)

Seq.-ID	RNA/Peptídeo	Sequência	Referência interna
79	L-RNA (SPIEGELMER)	GUGCUGCGGGGGUUAGGGCUAGAAGUCGGCCUGCAGCAC	197-B2
80	L-RNA (SPIEGELMER)	AGCGUGGCGAGGUUAGGGCUAGAAGUCGGUCGACACGCU	191-D5-001
81	L-RNA (SPIEGELMER)	GUGUUGCGGAGGUUAGGGCUAGAAGUCGGUCAGCAGCAC	197-H1
82	L-RNA (SPIEGELMER)	CGUGCGCUUGAGAUAGGGGUUAGGGCUUAAAGUCGGCUGAUUCUCACG	190-A3-001
83	L-RNA (SPIEGELMER)	AGCGUGAAGGGGUUAGGGCUCGAAGUCGGCUGACACGCU	191-A5
84	L-RNA (SPIEGELMER)	GUGCUGCGGGGGUUAGGGCUCGAAGUCGGCCCGCAGCAC	197-H3
85	L-RNA (SPIEGELMER)	GUGUUCCCGGGGUUAGGGCUUGAAGUCGGCCGGCAGCAC	197-B1
86	L-RNA (SPIEGELMER)	GUGUUGCAGGGGUUAGGGCUUGAAGUCGGCCUGCAGCAC	197-E3
87	L-RNA (SPIEGELMER)	GUGCUGCGGGGGUUAGGGCUCAAAGUCGGCCUGCAGCAC	197-H2
88	L-RNA (SPIEGELMER)	GUGCUGCCGGGGUUAGGGCUAA-AGUCGGCCGACAGCAC	197-D1
89	L-RNA (SPIEGELMER)	GUGCUGUGGGGGUCAGGGCUAGAAGUCGGCCUGCAGCAC	197-D2
90	L-RNA (SPIEGELMER)	GGUYAGGGCUHRX$_A$AGUCGG; X$_A$ = A ou ausente	Tipo C Fórmula-1
91	L-RNA (SPIEGELMER)	GGUYAGGGCUHRAAGUCGG	Tipo C Fórmula-2
92	L-RNA (SPIEGELMER)	GGUYAGGGCUHRAGUCGG	Tipo C Fórmula-3
93	L-RNA (SPIEGELMER)	GGUUAGGGCUHGAAGUCGG	Tipo C Fórmula-4
94	L-RNA (SPIEGELMER)	UGAGAUAGGGGUUAGGGCUUAAAGUCGGCUGAUUCUCA	190-A3-003

TABELA 1 G)

Seq.-ID	RNA/Peptídeo	Sequência	Referência interna
95	L-RNA (SPIEGELMER)	GAGAUAGGGGUUAGGGCUUAAAGUCGGCUGAUUCUC	190-A3-004
96	L-RNA (SPIEGELMER)	GGGGUUAGGGCUUAAAGUCGGCUGAUUCU	190-A3-007
97	L-RNA (SPIEGELMER)	GCGUGGCGAGGUUAGGGCUAGAAGUCGGUCGACACGC	191-D5-002
98	L-RNA (SPIEGELMER)	CGUGGCGAGGUUAGGGCUAGAAGUCGGUCGACACG	191-D5-003
99	L-RNA (SPIEGELMER)	CGGGCGAGGUUAGGGCUAGAAGUCGGUCGACCG	191-D5-004
100	L-RNA (SPIEGELMER)	CGGGCGAGGUUAGGGCUAGAAGUCGGUCGCCCG	191-D5-005
101	L-RNA (SPIEGELMER)	CGGCGAGGUUAGGGCUAGAAGUCGGUCGCCG	191-D5-006
102	L-RNA (SPIEGELMER)	CGGGAGGUUAGGGCUAGAAGUCGGUCCCG	191-D5-007
103	L-RNA (SPIEGELMER)	GGGAGGUUAGGGCUAGAAGUCGGUCCC	191-D5-010
104	L-RNA (SPIEGELMER)	CCGCGGUUAGGGCUAGAAGUCGGGCGG	191-D5-017
105	L-RNA (SPIEGELMER)	CCCGGGUUAGGGCUAGAAGUCGGCGGG	191-D5-029
106	L-RNA (SPIEGELMER)	GGCGGGUUAGGGCUAGAAGUCGGCGCC	191-D5-024
107	L-RNA (SPIEGELMER)	CCCGCGGUUAGGGCUAGAAGUCGGGCGGG	191-D5-017-29a
108	L-RNA (SPIEGELMER)	GCCGCGGUUAGGGCUAGAAGUCGGGCGGC	191-D5-017-29b
109	L-RNA (SPIEGELMER)	CCCCGGGUUAGGGCUAGAAGUCGGCGGGG	191-D5-019-29a
110	L-RNA (SPIEGELMER)	CGGCGGGUUAGGGCUAGAAGUCGGCGCCG	191-D5-024-29a
111	L-RNA (SPIEGELMER)	GGGCGGGUUAGGGCUAGAAGUCGGCGCCC	191-D5-024-29b

TABELA 1 (H)

Seq.-ID	RNA/Peptídeo	Sequência	Referência interna
112	L-RNA (SPIEGELMER)	UGCUGCGGGGGUUAGGGCUAGAAGUCGGCCUGCAGCA	197-B2-001
113	L-RNA (SPIEGELMER)	GCUGCGGGGGUUAGGGCUAGAAGUCGGCCUGCAGC	197-B2-002
114	L-RNA (SPIEGELMER)	CUGGGGGGGUUAGGGCUAGAAGUCGGCCUGCAG	197-B2-003
115	L-RNA (SPIEGELMER)	UGCGGGGGUUAGGGCUAGAAGUCGGCCUGCA	197-B2-004
116	L-RNA (SPIEGELMER)	GCGGGGGUUAGGGCUAGAAGUCGGCCUGC	197-B2-005
117	L-RNA (SPIEGELMER)	GCCGGGGUUAGGGCUAGAAGUCGGCCGGC	197-B2-006
118	L-RNA (SPIEGELMER)	GGCCGGGGUUAGGGCUAGAAGUCGGCCGGCC	197-B2-006-31a
119	L-RNA (SPIEGELMER)	CGCCGGGGUUAGGGCUAGAAGUCGGCCGGCG	197-B2-006-31b
120	L-RNA (SPIEGELMER)	RKSBUSNVGR	Tipo C Fórmula-5-5'
121	L-RNA (SPIEGELMER)	YYNRCASSMY	Tipo C Fórmula-5-3'
122	L-RNA (SPIEGELMER)	RKSBUGSVGR	Tipo C Fórmula-6-5'
123	L-RNA (SPIEGELMER)	YCNRCASSMY	Tipo C Fórmula-6-3'
124	L-RNA (SPIEGELMER)	X_SSSSV; X_s = S ou ausente	Tipo C Fórmula-7-5'
125	L-RNA (SPIEGELMER)	BSSSX_S; X_s = S ou ausente	Tipo C Fórmula-7-3'
126	L-RNA (SPIEGELMER)	SGGSV	Tipo C Fórmula-8-5'
127	L-RNA (SPIEGELMER)	YSCCS	Tipo C Fórmula-8-3'

TABELA 1 (I)

Seq.-ID	RNA/Peptídeo	Sequência	Referência interna
128	L-RNA (SPIEGELMER)	GCSGG	Tipo C Fórmula-9-5'
129	L-RNA (SPIEGELMER)	CCKGC	Tipo C Fórmula-9-3'
130	L-RNA (SPIEGELMER)	SSSSR	Tipo C Fórmula-IDS'
131	L-RNA (SPIEGELMER)	YSBSS	Tipo C Fórmula-10-3'
132	L-RNA (SPIEGELMER)	5'-40 kDa-PEG-GCGUGGUGUGAUCUAGAUGUAUUGGCUGAUCCUAGUCAGGUACGC	193-G2-012-5'-PEG, NOX-A12-JE4 0
133	L-RNA (SPIEGELMER)	5'-4 0 kDa-PEG-GCGUGAAAGCAACAUGUCAAUGAAAGGUAGCCGCGC	192-A10-008-5'-PEG
134	L-RNA (SPIEGELMER)	5'-4 0 kDa-PEG-CGGGAGGUUAGGGCUAGAAGUCGGUCCCG	191-D5-007-5'-PEG
135	L-RNA (SPIEGELMER)	5'-4 0 kDa-PEG-GCCGGGGUUAGGGCUAGAAGUCGGCCGGC	197-B2-006-5'-PEG
136	L-RNA (SPIEGELMER)	5'-4 0 kDa-PEG-CGCCGGGGUUAGGGCUAGAAGUCGGCCGGCG	197-B2-006-31b-5'PEG
137	L-RNA (SPIEGELMER)	5'-40 kDa-PEG-GCUGUGAAAGCAACAUGUCAAUGAAAGGUAGCCGCAGC	192-A10-001-5'-PEG 192-A10-001-5'-PEG40
138	L-RNA (SPIEGELMER)	UAAGGAAACUCGGUCUGAUGCGGUAGCGCUGUGCAGAGCU	Controle Spiegelmer
139	L-RNA (SPIEGELMER)	5'-30 kDa-PEG-GCUGUGAAAGCAACAUGUCAAUGAAAGGUAGCCGCAGC	192-A10-001-5'-PEG30

TABELA 1 (J)

Seq.-ID	RNA/Peptídeo	Sequência	Referência interna
140	L-RNA (SPIEGELMER)	5'-100 kDa-HES-GCUGUGAAAGCAACAUGUCAAUGAAAGGUAGCCGCAGC	192-A10-001-5'-HES100
141	L-RNA (SPIEGELMER)	5'-130 kDa-HES-GCUGUGAAAGCAACAUGUCAAUGAAAGGUAGCCGCAGC	192-A10-001-5'-HES130
142	L-RNA (SPIEGELMER)	CGUGGUCCGUUGUGUCAGGUCUAUUCGCCCCGGUGCAGGGCAUCCGCG	194-A2-001
143	L-RNA (SPIEGELMER)	GCAGUGUGACGCGGACGUGAUAGGACAGAGCUGAUCCCGCUCAGGUGAG	196-B12-003
144	L-RNA (SPIEGELMER)	CAACAGCAGUGUGACGCGGACGUGAUAGGACAGAGCUGAUCCCGCUCAG	196-B12-004
145	D-RNA (APTÂMERO)	GCUGUGAAAGCAACAUGUCAAUGAAAGGUAGCCGCAGC	192-A10-001
146	D-RNA (APTÂMERO)	GCUGUGAAAGUAACAUGUCAAUGAAAGGU7!LACCACAGC	192-G10
147	D-RNA (APTÂMERO)	GCUGUGAAAGUAACACGUCAAUGAAAGGUAACCGCAGC	192-F10
148	D-RNA (APTÂMERO)	GCUGUGAAAGUAACACGUCAAUGAAAGGUAACCACAGC	192-B11
149	D-RNA (APTÂMERO)	GCUGUAAAAGUAACAUGUCAAUGAAAGGUZiACUACAGC	192-C9
150	D-RNA (APTÂMERO)	GCUGUAAAAGUAACAAGUCAAUGAAAGGUAACUACAGC	192-E10
151	D-RNA (APTÂMERO)	GCUGUGAAAGUAACAAGUCAAUGAAAGGUAACCACAGC	192-C10
152	D-RNA (APTÂMERO)	GCAGUGAAAGUAACAUGUCAAUGAAAGGUAACCACAGC	192-D11
153	D-RNA (APTÂMERO)	GCUGUGAAAGUAACAUGUCAAUGAAAGGUAACCACUGC	192-G11

TABELA 1 (K)

Seq.-ID	RNA/Peptídeo	Sequência	Referência interna
154	D-RNA (APTÂMERO)	GCUAUGAAAGUAACAUGUCAAUGAAAGGUAACCAUAGC	192-H11
155	D-RNA (APTÂMERO)	GCUGCGAAAGCGACAUGUCAAUGAAAGGUAGCCGCAGC	192-D10
156	D-RNA (APTÂMERO)	GCUGUGAAAGCAACAUGUCAAUGAAAGGUAGCCACAGC	192-E9
157	D-RNA (APTÂMERO)	GCUGUGAAAGUAACAUGUCAAUGAAAGGUAGCCGCAGC	192-H9
158	D-RNA (APTÂMERO)	AGCGUGAAAGUAACACGUAAAAUGAAAGGUAACCACGCU	191-A6
159	D-RNA (APTÂMERO)	CUGUGAAAGCAACAUGUCAAUGAAAGGUAGCCGCAG	192-A10-002
160	D-RNA (APTÂMERO)	UGUGAAAGCAACAUGUCAAUGAAAGGUAGCCGCA	192-A10-003
161	D-RNA (APTÂMERO)	GUGAAAGCAACAUGUCAAUGAAAGGUAGCCGC	192-A10-004
162	D-RNA (APTÂMERO)	UGAAAGCAACAUGUCAAUGAAAGGUAGCCG	192-A10-005
163	D-RNA (APTÂMERO)	GAAAGCAACAUGUCAAUGAAAGGUAGCC	192-A10-006
164	D-RNA (APTÂMERO)	AAAGCAACAUGUCAAUGAAAGGUAGC	192-A10-007
165	D-RNA (APTÂMERO)	GCGUGAAAGCAACAUGUCAAUGAAAGGUAGCCGCGC	192-A10-008
166	D-RNA (APTÂMERO)	GCGCGAAAGCAACAUGUCAAUGAAAGGUAGCCGCGC	192-A10-015
167	D-RNA (APTÂMERO)	GCGGAAAGCAACAUGUCAAUGAAAGGUAGCCCGC	192-A10-014
168	D-RNA (APTÂMERO)	CGUGAAAGCAACAUGUCAAUGAAAGGUAGCCGCG	192-A10-016
169	D-RNA (APTÂMERO)	GCGCAAAGCAACAUGUCAAUGAAAGGUAGCGUGC	192-A10-017

TABELA 1 (L)

Seq.-ID	RNA/Peptídeo	Sequência	Referência interna
170	D-RNA (APTÂMERO)	GUGCAAAGCAACAUGUCAAUGAAAGGUAGCGCGC	192-A10-018
171	D-RNA (APTÂMERO)	CGCGAAAGCAACAUGUCAAUGAAAGGUAGCCGUG	192-A10-019
172	D-RNA (APTÂMERO)	GGGCAAAGCAACAUGUCAAUGAAAGGUAGCGCCC	192-A10-020
173	D-RNA (APTÂMERO)	GGCCAAAGCAACAUGUCAAUGAAAGGUAGCGGCC	192-A10-021
174	D-RNA (APTÂMERO)	GCCCAAAGCAACAUGUCAAUGAAAGGUAGCGGGC	192-A10-022
175	D-RNA (APTÂMERO)	CCCCAAAGCAACAUGUCAAUGAAAGGUAGCGGGG	192-A10-023
176	D-RNA (APTÂMERO)	AGCGUGGUGUGAUCUAGAUGUAGUGGCUGAUCCUAGUCAGGUACGCU	193-C2-001
177	D-RNA (APTÂMERO)	AGCGUGGUGUGAUCUAGAUGUAUUGGCUGAUCCUAGUCAGGUACGCU	193-G2-001
178	D-RNA (APTÂMERO)	AGCGUGGUGUGAUCUAGAUGUAAUGGCUGAUCCUAGUCAGGUGCGCU	193-F2-001
179	D-RNA (APTÂMERO)	GCGAGGUGUGAUCUAGAUGUAGUGGCUGAUCCUAGUCAGGUGCGC	193-G1-002
180	D-RNA (APTÂMERO)	GCGUGGUGUGAUCUAGAUGUAGUGGCUGAUCCUAGUCAGGUGCGC	193-D2-002
181	D-RNA (APTÂMERO)	GCAUGGUGUGAUCUAGAUGUAGUGGCUGAUCCUAGUCAGGUGCCC	193-A1-002
182	D-RNA (APTÂMERO)	GCGUGGUGUGAUCUAGAUGUAAUGGCUGAUCCUAGUCAGGGACGC	193-D3-002
183	D-RNA (APTÂMERO)	GCGUGGUGUGAUCUAGAUGUAGAGGCUGAUCCUAGUCAGGUACGC	193-B3-002
184	D-RNA (APTÂMERO)	GCGUGGUGUGAUCUAGAUGUAAAGGCUGAUCCUAGUCAGGUACGC	193-H3-002

TABELA 1 (M)

Seq.-ID	RNA/Peptídeo	Sequência	Referência interna
185	D-RNA (APTÂMERO)	GCGUGGUGUGAUCUAGAUGUAGUGGCUGUUCCUAGUCAGGUAUGC	193-E3-002
186	D-RNA (APTÂMERO)	GCGUGGUGUGAUCUAGAUGUAGUGGCUGAUCCUAGUUAGGUACGC	193-D1-002
187	D-RNA (APTÂMERO)	GCGUGGUGUGAUCUAGAUGUAGUGGCUGAUCCUAGUCAGGUACGC	193-C2-002
188	D-RNA (APTÂMERO)	CGUGGUGUGAUCUAGAUGUAGUGGCUGAUCCUAGUCAGGUACG	193-C2-003
189	D-RNA (APTÂMERO)	GUGGUGUGAUCUAGAUGUAGUGGCUGAUCCUAGUCAGGUAC	193-C2-004
190	D-RNA (APTÂMERO)	UGGUGUGAUCUAGAUGUAGUGGCUGAUCCUAGUCAGGUA	193-C2-005
191	D-RNA (APTÂMERO)	GGUGUGAUCUAGAUGUAGUGGCUGAUCCUAGUCAGGU	193-C2-006
192	D-RNA (APTÂMERO)	GUGUGAUCUAGAUGUAGUGGCUGAUCCUAGUCAGG	193-C2-007
193	D-RNA (APTÂMERO)	GCGUGGUGUGAUCUAGAUGUAUUGGCUGAUCCUAGUCAGGUACGC	193-G2-012
194	D-RNA (APTÂMERO)	GCGCGGUGUGAUCUAGAUGUAUUGGCUGAUCCUAGUCAGGCGCGC	193-G2-013
195	D-RNA (APTÂMERO)	GCGCGUGUGAUCUAGAUGUAUUGGCUGAUCCUAGUCAGGGCGC	193-G2-014
196	D-RNA (APTÂMERO)	GGGCGUGUGAUCUAGAUGUAUUGGCUGAUCCUAGUCAGGGCCC	193-G2-015
197	D-RNA (APTÂMERO)	GGCCGUGUGAUCUAGAUGUAUUGGCUGAUCCUAGUCAGGGGCC	193-G2-016
198	D-RNA (APTÂMERO)	GCCCGUGUGAUCUAGAUGUAUUGGCUGAUCCUAGUCAGGGGGC	193-G2-017

TABELA 1 (N)

Seq.-ID	RNA/Peptídeo	Sequência	Referência interna
199	D-RNA (APTÂMERO)	GUGCUGCGGGGGUUAGGGCUAGAAGUCGGCCUGCAGCAC	197-B2
200	D-RNA (APTÂMERO)	AGCGUGGCGAGGUUAGGGCUAGAAGUCGGUCGACACGCU	191-D5-001
201	D-RNA (APTÂMERO)	GUGUUGCGGAGGUUAGGGCUAGAAGUCGGUCAGCAGCAC	197-H1
202	D-RNA (APTÂMERO)	CGUGCGCUUGAGAUAGGGGUUAGGGCUUAAAGUCGGCUGAUUCUCACG	190-A3-001
203	D-RNA (APTÂMERO)	AGCGUGAAGGGGUUAGGGCUCGAAGUCGGCUGACACGCU	191-A5
204	D-RNA (APTÂMERO)	GUGCUGCGGGGGUUAGGGCUCGAAGUCGGCCCGCAGCAC	197-H3
205	D-RNA (APTÂMERO)	GUGUUCCCGGGGUUAGGGCUUGAAGUCGGCCGGCAGCAC	197-B1
206	D-RNA (APTÂMERO)	GUGUUGCAGGGGUUAGGGCUUGAAGUCGGCCUGCAGCAC	197-E3
207	D-RNA (APTÂMERO)	GUGCUGCGGGGGUUAGGGCUCAAAGUCGGCCUGCAGCAC	197-H2
208	D-RNA (APTÂMERO)	GUGCUGCCGGGGUUAGGGCUAA-AGUCGGCCGACAGCAC	197-D1
209	D-RNA (APTÂMERO)	GUGCUGUGGGGGUCAGGGCUAGAAGUCGGCCUGCAGCAC	197-D2
210	D-RNA (APTÂMERO)	UGAGAUAGGGGUUAGGGCUUAAAGUCGGCUGAUUCUCA	190-A3-003
211	D-RNA (APTÂMERO)	GAGAUAGGGGUUAGGGCUUAAAGUCGGCUGAUUCUC	190-A3-004
212	D-RNA (APTÂMERO)	GGGGUUAGGGCUUAAAGUCGGCUGAUUCU	190-A3-007
213	D-RNA (APTÂMERO)	GCGUGGCGAGGUUAGGGCUAGAAGUCGGUCGACACGC	191-D5-002
214	D-RNA (APTÂMERO)	CGUGGCGAGGUUAGGGCUAGAAGUCGGUCGACACG	191-D5-003

TABELA 1 (O)

Seq.-ID	RNA/ Pep tide	Sequência	Referência interna
215	D-RNA (APTÂMERO)	CGGGCGAGGUUAGGGCUAGAAGUCGGUCGACCG	191-D5-004
216	D-RNA (APTÂMERO)	CGGGCGAGGUUAGGGCUAGAAGUCGGUCGCCCG	191-D5-005
217	D-RNA (APTÂMERO)	CGGCGAGGUUAGGGCUAGAAGUCGGUCGCCG	191-D5-006
218	D-RNA (APTÂMERO)	CGGGAGGUUAGGGCUAGAAGUCGGUCCCG	191-D5-007
219	D-RNA (APTÂMERO)	GGGAGGUUAGGGCUAGAAGUCGGUCCC	191-D5-010
220	D-RNA (APTÂMERO)	CCGCGGUUAGGGCUAGAAGUCGGGCGG	191-D5-017
221	D-RNA (APTÂMERO)	CCCGGGUUAGGGCUAGAAGUCGGCGGG	191-D5-029
222	D-RNA (APTÂMERO)	GGCGGGUUAGGGCUAGAAGUCGGCGCC	191-D5-024
223	D-RNA (APTÂMERO)	CCCGCGGUUAGGGCUAGAAGUCGGGCGGG	191-D5-017-29a
224	D-RNA (APTÂMERO)	GCCGCGGUUAGGGCUAGAAGUCGGGCGGC	191-D5-017-29b
225	D-RNA (APTÂMERO)	CCCCGGGUUAGGGCUAGAAGUCGGCGGGG	191-D5-019-29a
226	D-RNA (APTÂMERO)	CGGCGGGUUAGGGCUAGAAGUCGGCGCCG	191-D5-024-29a
227	D-RNA (APTÂMERO)	GGGCGGGUUAGGGCUAGAAGUCGGCGCCC	191-D5-024-29b
228	D-RNA (APTÂMERO)	UGCUGCGGGGGUUAGGGCUAGAAGUCGGCCUGCAGCA	197-B2-001

TABELA 1 (P)

Seq.-ID	RNA/Peptídeo	Sequência	Referência interna
229	D-RNA (APTÂMERO)	GCUGCGGGGGUUAGGGCUAGAAGUCGGCCUGCAGC	197-B2-002
230	D-RNA (APTÂMERO)	CUGCGGGGGUUAGGGCUAGAAGUCGGCCUGCAG	197-B2-003
231	D-RNA (APTÂMERO)	UGCGGGGGUUAGGGCUAGAAGUCGGCCUGCA	197-B2-004
232	D-RNA (APTÂMERO)	GCGGGGGUUAGGGCUAGAAGUCGGCCUGC	197-B2-005
233	D-RNA (APTÂMERO)	GCCGGGGUUAGGGCUAGAAGUCGGCCGGC	197-B2-006
234	D-RNA (APTÂMERO)	GGCCGGGGUUAGGGCUAGAAGUCGGCCGGCC	197-B2-006-31a
235	D-RNA (APTÂMERO)	CGCCGGGGUUAGGGCUAGAAGUCGGCCGGCG	197-B2-006-31b
236	D-RNA (APTÂMERO)	CGUGGUCCGUUGUGUCAGGUCUAUUCGCCCCGGUGCAGGGCAUCCGCG	194-A2-001
236	D-RNA (APTÂMERO)	GCAGUGUGACGCGGACGUGAUAGGACAGAGCUGAUCCCGCUCAGGUGAG	196-B12-003
238	D-RNA (APTÂMERO)	CAACAGCAGUGUGACGCGGACGUGAUAGGACAGAGCUGAUCCCGCUCAG	196-B12-004
239	L-RNA (Spiegelmer)	5'-PEG-UAAGGAAACUCGGUCUGAUGCGGUAGCGCUGUGCAGAGCU	Spiegelmer de Controle PEGilatado
240	L-RNA (SPIEGELMER)	5'-30 kDa-PEG-GCGUGGUGUGAUCUAGAUGUAUUGGCUGAUCCUAGUCAGGUACGC	NOX-A12-NO30
241	L-RNA (SPIEGELMER)	5'-40 kDa-PEG-CGCAUGGACUGAUCCUAGUCGGUUAUGUAGJAUCUAGUGUGGUGCG	revNOX-A12-JE40

[000358] A presente invenção é adicionalmente ilustrada pelas figuras, exemplos e a listagem de sequência a partir das quais características, concretizações e vantagens adicionais podem ser tomadas, no qual

[000359] A Figura 1 mostra um alinhamento de sequências de ligação de ligantes de RNA a SDF-1 humana indicando o motivo de sequência ("Tipo A") que está em uma concretização preferida em sua totalidade essencial para ligação a SDF-1 humana;

[000360] A Figura 2A mostra derivados de ligante de RNA 192-A10-001 (ligante de RNA de SDF-1 humana de motivo de sequência "Tipo A");

[000361] A Figura 2B mostra derivados de ligante de RNA 192-A10-001 (ligante de RNA de SDF-1 humana de motivo de sequência "Tipo A");

[000362] A Figura 3 mostra um alinhamento de sequências de ligantes de RNA relacionados que se ligam a SDF-1 humana indicando o motivo de sequência ("Tipo B") que está em uma concretização preferida em sua totalidade essencial para ligação a SDF-1 humana;

[000363] A Figura 4A mostra derivados de ligantes de RNA 193-C2-001 e 193-G2-001 (ligantes de RNA de SDF-1 humana de motivo de sequência "Tipo B");

[000364] A Figura 4B mostra derivados de ligantes de RNA 193-C2-001 e 193-G2-001 (ligante de RNA de SDF-1 humana de motivo de sequência "Tipo B");

[000365] A Figura 5 mostra um alinhamento de sequências de ligantes de RNA relacionados que se ligam a SDF-1 humana indicando o motivo de sequência ("Tipo C") que está em uma concretização preferida em sua totalidade essencial para ligação a SDF-1 humana;

[000366] A Figura 6 mostra derivados de ligante de RNA 190-A3-001 (ligante de RNA de SDF-1 humana de motivo de sequência "Tipo C);

[000367] A Figura 7A mostra derivados de ligante de RNA 190-D5-001 (ligante de RNA de SDF-1 humana de motivo de sequência "Tipo C");

[000368] A Figura 7B mostra derivados de ligante de RNA 190-D5-001 (ligante de RNA de SDF-1 humana de motivo de sequência "Tipo C");

[000369] A Figura 8 mostra derivados de ligante de RNA 197-B2 (ligante de RNA de SDF-1 humana de motivo de sequência "Tipo C");

[000370] A Figura 9 mostra outros ligantes de RNA que se ligam a SDF-1 humana;

[000371] A Figura 10 mostra a quimiotaxia induzida por SDF-1 humana de células de leucemia de célula T humana onde após 3 horas, a migração de células de leucemia de célula T humana de Jurkat para várias concentrações de SDF-1 humana uma curva de resposta de dose para SDF-1 humana foi obtida, representada como sinal de fluorescência sobre concentração de SDF-1 humana;

[000372] A Figura 11 mostra o resultado de uma análise de ligação da SDF-1 humana que se liga ao APTÂMERO 192-A10-001 para D-SDF-1 humana biotinilatada 37°C, representada como ligação do APTÂMERO sobre concentração de D-SDF-1 humana biotinilatada;

[000373] A Figura 12 mostra a eficácia de SDF-1 humana de ligação de Spiegelmer 192-A10-001 em um ensaio de quimiotaxia; células foram permitidas migrarem para a 0,3 nM de SDF-1 humana pré-incubada a 37°C com várias quantidades de Spiegelmer 192-A10-001, representadas como percentagens de controle sobre concentração de Spiegelmer 192-A10-001;

[000374] A Figura 13 mostra o resultado de uma análise de ligação competitiva dos aptâmeros de ligação de SDF-1 humana 192-A10-001, 192-F10-001, 192-C9-001, 192-E10-001, 192-C10-001, 192-D11-001, 192-G11-001, 192-H11-001, 192-D10-001, 192-E9-001 e 192-H9-001

a D-SDF-1 humana biotinilatada a 37°C, representada como ligação do APTÂMERO etiquetado 192-A 10-001 (usado como referência que é deslocado pelos aptâmeros não-etiquetados) a 1 nM e 5 nM de aptâmeros não-etiquetados 192-A10-001, 192-F10-001, 192-C9-001, 192-E10-001, 192-C10-001, 192-D11-001, 192-G11-001, 192-H11-001, 192-D10-001, 192-E9-001 e 192-H9-001;

[000375] A Figura 14 mostra o resultado de uma análise de ligação do APTÂMERO de ligação de SDF-1 humana 192-A10-008 a D-SDF-1 humana biotinilatada a 37°C, representada como ligação do APTÂMERO sobre concentração de D-SDF-1 humana biotinilatada;

[000376] A Figura 15 mostra um sensograma Biacore 2000 indicando o valor K_D da ligação de SDF-1 humana Spiegelmer 192-A10-008 que se liga a SDF-1 humana que foi imobilizada em um chip sensor PioneerFl por procedimento de acoplamento de amina, representado como resposta (RU) sobre tempo, adicionalmente as taxas liga e desliga e os valores K_D de Spiegelmers 192-A10-008 e 192-A10-001 são listados;

[000377] A Figura 16 mostra a eficácia de ligação de SDF-1 Spiegelmer 192-A 10-008 em um ensaio de quimiotaxia; as células foram permitidas migrar para 0,3 nM de SDF-1 humana pré-incubada a 37°C com várias quantidades de Spiegelmer 192-Al0-008, representada como percentagem de controle sobre concentração de Spiegelmer 192-A10-008;

[000378] A Figura 17 mostra um sensograma Biacore 2000 indicando o valor K_D de Spiegelmer 193-G2-01 de ligação a SDF-1 humana que foi imobilizado em um chip sensor de PioneerFl por procedimento de acoplamento de amina, representado como resposta (RU) sobre o tempo, adicionalmente as taxas liga e desliga e os valores K_D de Spiegelmers 193-G2-001 e 193-C2-001, são listados;

[000379] A Figura 18 mostra o resultado de uma análise de ligação

do APTÂMERO de anti-SDF-1 humana 193-G2-012 para D-SDF-1 humana biotinilatada a 37°C, representado como ligação do APTÂMERO sobre concentração de D-SDF-1 humana biotinilatada;

[000380] A Figura 19 mostra o resultado de uma análise de ligação competitiva dos aptâmeros de ligação de SDF-1 humana 190-A3-001, 190-A3-003, 190-A3-004, 190-A3-007, 191-D5-001, 191-D5-002, 191-D5-003, 191-D5-004, 191-D5-005, 191-D5-006 e 191-D5-007 para D-SDF-1 humana biotinilatada a 37°C, representado como ligação do APTÂMERO etiquetado 190-A3-001 ou 191-D5-001 (usado como referência que é deslocado pelos aptâmeros não-etiquetados) a 500 nM, a 50 nM e a 10 nM de aptâmeros não-etiquetados 190-A3-001, 190-A3-003, 190-A3-004, 190-A3-007, 191-D5-001, 191-D5-002, 191-D5-003, 191-D5-004,191-D5-005,191-D5-006 e 191-D5-007;

[000381] A Figura 20 mostra o resultado de uma análise de ligação dos aptâmeros de ligação de SDF-1 humana 190-A3-004 e 191-D5-007 para D-SDF-1 humana biotinilatada 37°C, representadas como ligação do APTÂMERO sobre concentração de D-SDF-1 humana biotinilatada;

[000382] A Figura 21 mostra um sensograma Biacore 2000 indicando o valor K_D de Spiegelmer 191-D5-007 de ligação a SDF-1 humana que foi imobilizado em chip sensor PioneerFl por procedimento de acoplamento de amina, representado como resposta (RU) sobre o tempo, adicionalmente as taxas liga e desliga e os valores K_D de Spiegelmers 191-D5-001, 191-D5-007, 190-A3-003 e 197-B2, são listados;

[000383] A Figura 22 mostra a eficácia de ligação de SDF-1 Spiegelmer 190-A3-004 em um ensaio de quimiotaxia; as células foram permitidas migrarem a 0,3 nM de SDF-1 humana pré-incubada a 37°C com várias quantidades de Spiegelmer 190-A3-004, representadas como percentagem de controle sobre a concentração

de Spiegelmer 190-A3-004;

[000384] A Figura 23A mostra a eficácia de ligação de SDF-1 Spiegelmers 193-G2-012-5'-PEG, 197-B2-006-5'-PEG, 191-D5-007-5'-PEG e 191-A10-008-5'-PEG em um ensaio de quimiotaxia; as células foram permitidas migrarem para 0,3 nM de SDF-1 humana pré-incubada a 37°C com várias quantidades de Spiegelmers 193-G2-012-5'-PEG, 197-B2-006-5'-PEG, 191-D5-007-5'-PEG e I91-A10-008-5'-PEG, representadas como percentagem de controle sobre concentração de Spiegelmers 193-G2-012-5'-PEG, 197-B2-006-5'-PEG, 191-D5-007-5'-PEG e 191-A10-008-5'-PEG;

[000385] A Figura 23B mostra a eficácia de ligação de SDF-1 Spiegelmers 197-B2-006-5PEG e 197-B2-006-31b-5'-PEG em um ensaio de quimiotaxia; células foram permitidas migrarem para 0,3 nM de SDF-1 humana pré-incubada a 37°C com várias quantidades de Spiegelmers 197-B2-006-5PEG e 197-B2-006-31b-5'-PEG, representadas como percentagem de controle sobre concentração de Spiegelmers 197-B2-006-5'PEGand 197-B2-006-31b-5'-PEG;

[000386] A Figura 24A mostra um sensograma de Biacore 2000 indicando os valores K_D de Spiegelmers 193-G2-012-5'-PEG, 191-A10-008-5'-PEG e 191-A10-001-5'-PEG que se ligam a SDF-1 humana que foi imobilizado em chip sensor de PioneerFl pelo procedimento de acoplamento de amina, representado como resposta (RU) sobre o tempo;

[000387] A Figura 24B mostra um sensograma Biacore 2000 indicando os valores K_D de Spiegelmers 197-B2-006-5PEG, 197-B2-006-31b-5'-PEG e 191-D5-007-5'-PEG que se ligam a SDF-1 humana que foi imobilizado em um chip sensor de PioneerFl por procedimento de acoplamento de amina, representado como resposta (RU) sobre o tempo;

[000388] A Figura 25A mostra a eficácia de ligação de SDF-1

Spiegelmers 192-A10-001, 192-A10-001-5'-HES130 e 192-A10-001-5'-HES100 em um ensaio de quimiotaxia; as células foram permitidas migrarem para 0,3 nM de SDF-1 humana pré-incubada a 37°C com várias quantidades de Spiegelmers 192-A10-001, 192-A 10-001-5'-HES130 e 192-A10-001-5'-HES100, representadas como percentagem de controle sobre concentração de Spiegelmers 192-A10-001, 192-A10-001-5'-HES130 e 192-A10-001-5'-HES100;

[000389] A Figura 25B mostra a eficácia de ligação de SDF-1 Spiegelmers 192-A10-001, 192-A10-001-5'-PEG30 e 192-A10-001-5'-PEG40 em um ensaio de quimiotaxia; as células foram permitidas migrarem para 0,3 nM de SDF-1 humana pré-incubadas a 37°C com várias quantidades de Spiegelmers 192-A10-001, 192-A10-001-5'-PEG30 e 192-A10-001-5'-PEG40, representadas como percentagem de controle sobre concentração de Spiegelmers 192-A10-001, 192-A10-001-5'-PEG30 e 192-A10-001-5'-PEG40;

[000390] A Figura 26 mostra a eficácia de um controle-Spiegelmer em um ensaio de quimiotaxia; as células foram permitidas migrarem para 0,3 nM de SDF-1 humana ou de murina pré-incubadas a 37°C com várias quantidades de controle-Spiegelmer, representadas como percentagem de controle sobre concentração de controle Spiegelmer;

[000391] A Figura 27 mostra a quimiotaxia induzida por SDF-1 de murina de células de leucemia de célula T humana de Jurkat onde após 3 horas migração de células de leucemia de célula T humana de Jurkat para várias concentrações de SDF-1, uma curva de resposta de dose para SDF-1 foi obtida, representada como sinal de fluorescência;

[000392] A Figura 28 mostra a eficácia de ligação de SDF-1 Spiegelmers 192-A10-001 e 191-D5-007-5PEG em um ensaio de quimiotaxia; as células foram permitidas migrarem para 0,3 nM de SDF-1 de murina pré-incubada a 37°C com várias quantidades de Spiegelmers 192-A10-001 e 191-D5-007-5PEG representadas como

percentagem de controle sobre concentração de Spiegelmers 192-A 10-001 e 191-D5-007-5PEG;

[000393] A Figura 29 mostra a eficácia de ligação de SDF-1 Spiegelmer 192-A10-001 em um ensaio de ligação de receptor de CXCR4 usando [^{125}J]-SDF-lα humano foi pré-incubado a 37°C com várias quantidades de Spiegelmers 192-A10-001, especificamente ligado, [^{125}J]-SDF-1 α foi plotado sobre concentração de Spiegelmer 192-A10-001; e

[000394] A Figura 30 mostra a inibição de estimulação de MAP-quinase de células de expressão de CXCR4 com 1 nM de SDF-lα humana por ligação de SDF-1 humana Spiegelmer 192-A10-001;

[000395] A Figura 31 mostra a inibição de germinação induzida por SDF-1 por ligação de SDF-1 humana Spiegelmer 193-G2-012-5'-PEG e por Spiegelmer de Controle PEGilatado em ensaio de germinação de anel aórtico, pelo que anéis de aorta de rato foram embutidos em matriz de colágeno e incubados por 6 dias com SDF-1 com ou sem Spiegelmers (a: controle; b: 10 nM SDF-1; c: 10 nM SDF-1 + 1 μM de ligação de SDF-1 humana Spiegelmer 193-G2-012-5'-PEG; d: 10 nM SDF-1 + 1 μM de Spiegelmer de Controle PEGilatado);

[000396] A Figura 32 mostra a inibição de germinação induzida por SDF-1 por ligação de SDF-1 humana Spiegelmer 193-G2-012-5'-PEG e por Spiegelmer de Controle PEGilatado em ensaio de germinação de anel aórtico pelo que os índices de germinação são mostrados como média +/- SD para 5 anéis por condição (*: o valor para SDF-1 é significantemente diferente do controle (teste de Mann-Whitney; p= 0,009); **: o valor para SDF-1 + humana SDF-1 de ligação Spiegelmer 193-G2-012-5'-PEG é significantemente diferente daquele para SDF-1 (teste de Mann-Whitney; p= 0,028);

[000397] A Figura 33 mostra uma representação esquemática de tratamento de animal e aplicação de métodos para gerar os dados de

liberação de célula-tronco de acordo com o Exemplo 10;

[000398] A Figura 34 mostra o número absoluto de células CD 117+ e Ly-6 A/E+ células (células-tronco hematopoiéticas / células progenitoras hematopoiéticas) por microlitro de plasma liberado 1 a 48 horas após injeção intravenosa de NOX-A12-JE40, NOX-A12-NO30, revNOX-A12-JE40 (controle spiegelmer), AMD3100, G-CSF (Neupogen) ou veículo (5% de glicose); o gráfico mostra valores médios e desvio-padrão;

[000399] A Figura 35 mostra unidades de formação de colônia por µL de sangue de camundongos C57BL/6 após 6 horas para derivados de NOX-A12, e AMD3100, ou 48 horas para G-CSF (Neupogen), e injeção de veículo conforme indicado na legenda; o diagrama mostra valores médios e desvios-padrão de 5 camundongos (cada triplicata);

[000400] A Figura 36 mostra os resultados do estudo coroidal de neovascularização induzida por laser em camundongos, pelo que NOX-A12-JE40 reduz a área neovascularizada no olho tratado de NOX-A12-JE40 em comparação direta à área no olho tratado com veículo (solução de Ringer) do mesmo animal (diagrama esquerdo); as áreas neovasculares médias de lesões individuais em NOX-A12-JE40 e olhos de camundongo tratados com veículo após dano de laser são mostrados no diagrama à direita;

[000401] A Figura 37 mostra os resultados de tratamento repetido de camundongos saudáveis e camundongos diabéticos com e sem uninefrectomia com veículo, NOX-A12-JE40, revNOX-A12-JE40 (controle Spiegelmer) pelo que NOX-A12-JE40 aperfeiçoa as contagens de glomerulosclerose;

[000402] A Figura 38 mostra os resultados de um modelo de animal para derrame vascular retiniano após indução por VEGF administrado intravítreo e tratamento dos animais com concentrações diferentes da ligação de SDF-1 Spiegelmer NOX-A12-JE40, veículo ou Kenacort

retart; neste modelo, a permeabilidade da vasculatura retiniana foi medida por fotometria de fluoresceína 48 horas após injeção intravítrea de VEGF;

[000403] A Figura 39 mostra as contagens de retinopatia (ou tratado com veículo [eixo x] vs. olho tratado com Spiegelmer NOX-A12-JE40 [eixo y]) de camundongos individuais em modelo de camundongo de retinopatia induzida por oxigênio que é um modelo par a imitação de neovascularização induzida por hipóxia da retina, conforme observado na retinopatia diabética ou AMD;

[000404] A Figura 40 mostra os valores p para a diferença estatística entre olhos tratados com Spiegelmer NOX-A12-JE40 e olhos tratados com veículo para os parâmetros individualmente medidos da retinopatia e da contagem de retinopatia conforme medidos no modelo de camundongo de retinopatia induzida por oxigênio que é um modelo para a imitação de neovascularização induzida por hipóxia da retina, conforme observado na retinopatia diabética e AMD; os valores p foram determinados usando o teste de ranque sinalizado de Wilcoxon;

[000405] A Figura 41 mostra contagem de célula de sangue branca após administração intravenosa de 13,4 mg (calculada relacionada a parte oligo) de ácido nucleico de ligação de SDF-1 NOX-A12-JE40, pelo que somente um ponto de tempo foi registrado após administração de veículo (5% de glicose), visto que isto foi assumido ser constante; contudo, NOX-A12_JE40 mobiliza uma quantidade razoável de células de sangue brancas em uma maneira reversível;

[000406] A Figura 42 mostra um resumo de indicações para transplantes de célula-tronco hematopoiética alogênica (abrev. HSCT) e números de paciente na Europa entre 1990 -2000 (Gratwohl, Baldomero e outros. 2002).;

[000407] A Figura 43 mostra um resumo de indicações para transplantes de célula-tronco hematopoiética autóloga (abrev. HSCT) e

números de paciente na Europa entre 1990 -2000 (Gratwohl, Baldomero e outros. 2002).

Exemplo 1: Ácido nucleicos que se ligam a SDF-1 humana

[000408] Usando-se D-SDF-1 humana biotinilatada como alvo, vários ácidos nucleicos que se ligam a SDF-1 humana podem ser gerados, as sequências de nucleotídeos de que são representadas nas Figuras 1 a 9. Os ácidos nucleicos foram caracterizados no APTÂMERO, isto é, nível de D-ácido nucleico com D-SDF-1 humana biotinilatada ou no nível de Spiegelmer, isto é, L-ácido nucleico com a configuração natural de SDF-1 (L- SDF-1).

[000409] Aptâmeros foram analisados com D- SDF-1 humana biotinilatada usando-se ensaios de ligação de enfraquecimento competitivos ou diretos com D-SDF-1 humana biotinilatada (Exemplo 4). Spiegelmers foram testados com a configuração natural de SDF-1 (L-SDF-1) por medição de ressonância de plasmônio de superfície usando-se um instrumento Biacore 2000 (Exemplo 6) e um ensaio de quimiotaxia *in vitro* de cultura de célula (Exemplo 5).

[000410] As moléculas de ácido nucleico desse modo geradas exibem motivos de sequência diferentes, três tipos principais são definidos nas Figuras 1, 2A e 2B (Tipo A), Figuras 3, 4A e 4B (Tipo B), Figuras 5, 6, 7A, 7B e 8 (Tipo C). Para definição de motivos de sequência de nucleotídeo, as abreviações IUPAC para nucleotídeos ambíguos são usadas:

S forte G ou C;

W fraca A ou U;

R purina G ou A;

Y pirimidina C ou U;

K ceto G ou U;

M imino A ou C;

B não A C ou U ou G;

D não C A ou G ou U;

H não G A ou C ou U;

V não U A ou C ou G;

[000411] Se não indicado ao contrário, qualquer sequência de ácido nucleico ou sequências de extensão e caixas, respectivamente, é indicada na direção 5' -> 3'.

1.1 Ácidos nucleicos de ligação SDF-1 Tipo A

[000412] Conforme representado na Figura 1, todas as sequências de ácidos nucleicos de ligação de SDF-1 de Tipo A compreendem uma sequência de nucleotídeo de núcleo que é flanqueada por extensões terminais 5'- e 3' que podem hibridizar uma com a outra. Contudo, tal hibridização não é necessariamente dada na molécula.

[000413] Os ácidos nucleicos foram caracterizados no nível de APTÂMERO usando-se ensaios de ligação de enfraquecimento diretos e competitivos com S-SDF-1 humana biotinilatada de modo a ranqueá-los com relação a seu comportamento de ligação (Exemplo 4). Sequências selecionadas foram sintetizadas como Spiegelmers (Exemplo 3) e foram testadas usando-se a configuração natural de SDF-1 (L-SDF) em um ensaio de quimiotaxia de cultura de célula *in vitro* (Exemplo 5) e por medição de ressonância de plasmônio de superfície usando-se um instrumento Biacore 2000 (Exemplo 6).

[000414] As sequências das caixas ou extensões definidas podem ser diferentes entre os ácidos nucleicos de ligação de SDF-1 de Tipo A que influencia a afinidade de ligação a SDF-1. Baseado na análise de ligação dos ácidos nucleicos de ligação de SDF-1 diferentes resumida como ácidos nucleicos de ligação de SDF-1 Tipo A, a sequência de nucleotídeo de núcleo e suas sequências de nucleotídeos conforme descrito em seguida estão individualmente e mais preferivelmente em sua totalidade essencial para ligação a SDF-1:

[000415] A sequência nucleotídeo de núcleo de todas as sequências

identificadas de ácidos nucleicos de ligação a SDF-1 Tipo A compartilham a sequência AAAGYRACAHGUMAAX$_A$UGAAAGGUARC (Tipo A Fórmula-1), pelo que X$_A$ é ou ausente ou é 'A'. Se 'A' é ausente, a sequência da sequência de nucleotídeo de núcleo pode ser resumida como Tipo A Fórmula-2 (AAAGYRACAHGUM-AAUGAAAGGUARC). Ácido nucleico de ligação de SDF-1 Tipo A 191-A6 (sequência de nucleotídeo de núcleo: AAAGUAACACAA-AAUGAAAGGUAAC) transportando o nucleotídeo 'A' adicional dentro da sequência de nucleotídeo de núcleo e ainda ligando a SDF-1 deixa concluir uma sequência de nucleotídeo de núcleo alternativa (AAAGYRACAHGUMAAAUGAAAGGUARC, Tipo A Fórmula-3). Exemplarmente para todos os outros ácidos nucleicos de ácidos nucleicos de ligação de SDF-1 Tipo A, o ácido nucleico de ligação a SDF-1 Tipo A foi caracterizado por sua afinidade de ligação a SDF-1 humana. A constante de ligação de equilíbrio K$_D$ foi determinada usando-se o ensaio de ligação de enfraquecimento (K$_D$ =1,5 nM, Figura 11) e por medição de ressonância de plasmônio de superfície (K$_D$ =1,0 nM, Figura 15). A IC50 (concentração inibitória 50%) de 0,12 nM para 192-A10-001 foi medida usando-se um ensaio de quimiotaxia de cultura de célula *in* (Figura 12). Consequentemente, todos os ácidos nucleicos de ligação a SDF-1 Tipo A conforme representado na Figura 1 foram analisados em um ensaio de ligação de enfraquecimento competitivo vs. 192-A10-001 (Figura 13; nem todos os ácidos nucleicos de ligação a SDF-1 Tipo A testados são mostrados na Figura 13). Os ácidos nucleicos de ligação a SDF-1 Tipo A 192-BII e 192-C10 mostraram afinidades de ligação iguais como 192-A 10-001 nestes experimentos de competição. Afinidade de ligação mais fraca foi determinada para ácidos nucleicos de ligação a SDF-1 Tipo A 192-G10, 192-F10, 192-C9, 192-E10, 192-D11, 192-G11, 192-H11 e 191-A6. Os ácidos nucleicos de ligação a SDF-1 Tipo A 192-D10, 192-E9 e

192-H9 têm afinidade de ligação muito mais fraca do que 192-A10-001 (Figura 13).

[000416] Conforme mencionado acima, os ácidos nucleicos de ligação a SDF-1 Tipo A 192-BII e 192-C10 exibem afinidade de ligação igual a SDF-1 como 192-A 10-001. Contudo, eles mostram leves diferenças na sequência de nucleotídeo da sequência nucleotídeo de núcleo. Portanto, a sequência de consenso das três moléculas que se ligam a SDF-1 com quase a mesma alta afinidade pode ser resumida pela sequência de nucleotídeo AAAGYAACAHGUCAAUGAAAGGUARC (Tipo A Fórmula-4) pelo que a sequência de nucleotídeo da sequência de nucleotídeo de núcleo de 192-A10-001 (sequência de nucleotídeo: AAAGCAACAUGUCAAUGAAAGGUAGC representa a sequência de nucleotídeo com a melhor afinidade de ligação de ácidos nucleicos de ligação a SDF-1 Tipo A.

[000417] Cinco ou seis fora dos seis nucleotídeos da extensão terminal 5' de ácidos nucleicos de ligação a SDF-1 Tipo A podem hibridizar para os respectivos cinco ou seis nucleotídeos fora dos seis nucleotídeos da extensão terminal 3' de ácidos nucleicos de ligação a SDF-1 Tipo A para formar uma espiral terminal. Embora estes nucleotídeos sejam variáveis em várias posições, os nucleotídeos diferentes permitem hibridização de cinco ou seis fora dos seis nucleotídeos das extensões terminais 5'- e 3' cada. As extensões terminais 5' e 3' de ácidos nucleicos de ligação a SDF-1 Tipo A conforme mostrado na Figura 1 pode ser resumidas em uma fórmula genérica para a extensão terminal 5'('RSHRYR', Tipo A Fórmula-5-5') e para a extensão terminal 3' ('YRYDSY', Tipo A Fórmula-5-3'). Derivados truncados de ácido nucleico de ligação a SDF-1 Tipo A 192-A10-001 foram analisados em um ensaio de ligação de enfraquecimento competitivo vs. A molécula original 192-A10-001 e

192-A10-008 (Figura 2A e 2B). Estes experimentos mostraram que uma redução dos seis nucleotídeos terminais (extremidade 5': GCUGUG; extremidade 3': CGCAGC) de 192-A10-001 a cinco nucleotídeos (extremidade 5''': CUGUG; extremidade 3': CGCAG) do derivado 192-A10-002 pode ser feita sem redução de afinidade de ligação. Contudo, o truncamento para quatro nucleotídeos terminais (extremidade 5': UGUG; extremidade 3': CGCA; 192-A10-003) ou menos (192-A10-004/ -005/ -006/ -007) conduz a afinidade de ligação reduzida para SDF-1 (Figura 2A). As extensões terminais 5' e 3' determinadas com um comprimento de cinco e quatro nucleotídeos dos derivados de ácido nucleico de ligação a SDF-1 Tipo A 192-Al 0-001 conforme mostrado nas Figuras 2A e B podem ser descritas em uma fórmula genérica para a extensão terminal 5' ('X_2BBBS', Tipo A Fórmula-6-5') e da extensão terminal 3' ('SBBVX_3'; Tipo A Fórmula-6-3'), pelo que X_2 é ou ausente ou é 'S' e X_3 é ou ausente ou é 'S'.

[000418] A sequência de nucleotídeo das extensões terminais 5' e 3' tem uma influência na afinidade de ligação de ácidos nucleicos de ligação a SDF-1 Tipo A. Isto não é somente mostrado pelos ácidos nucleicos 192-F10 e 192-E10, mas também por derivados de 192-A10-001 (Figura 2B;). As sequências de nucleotídeo de núcleos de 192-F10 e 192-E10 são idênticas a 192-B11 e 192-C10, mas compreendem leves diferenças na extremidade 3' de extensão terminal 5' e na extremidade 5' da extensão terminal 3' resultando em afinidade de ligação reduzida.

[000419] A substituição de nucleotídeos terminais 5'- e 3'- 'CUGUG' e 'CGCAG' de ácido nucleico de ligação a SDF-1 Tipo A 192-A10-002 por 'GCGCG' e 'CGCGC (192-A10-015) resultou em uma afinidade de ligação reduzida pelo que substituições por 'GCGUG' e 'CGCGC (192-A10-008) resultou na mesma afinidade de ligação conforme mostrado para 192-A10-002 (Figura 2B, Figura 15, Figura 12, Figura 16).

[000420] Adicionalmente, nove derivados de ácido nucleico de ligação a SDF-1 Tipo A 192-A10-001 (192-A10-014/ -015/ -016/ -017/ -018/ -019/ -020/ -021/ -022/ -023) suportando quatro nucleotídeos terminais 5'- e 3'- respectivamente foram testados como aptâmeros para sua afinidade de ligação vs. 192-Al0-001 ou seu derivado 192-Al 0-008 (ambos têm a afinidade de ligação idêntica a SDF-1). Todos os clones mostram afinidade de ligação mais fraca, muito mais fraca ou muito muito mais fraca para SDF-1 como 192-A 10-001 (seis nucleotídeos formando espira terminal), ou como 192-Al 0-008 com cinco nucleotídeos terminais, respectivamente (Figura 2B). Consequentemente, a sequência e o número de nucleotídeos das extensões terminais 5'- e 3'-são essenciais para uma ligação eficaz para SDF-1. Conforme mostrado para ácidos nucleicos de ligação a SDF-1 Tipo A 192-A10-002 e 192-A10-08, a combinação preferida de extensões terminais 5'- e 3'- são 'CUGUG' e 'CGCAG' (extensões terminais 5'- e 3' de ácido nucleico de ligação a SDF-1 Tipo A 192-A10-002) e 'GCGUG' e 'CGCGC (extensões terminais 5'- e 3' de ácido nucleico de ligação a SDF-1 Tipo A 192-Al 0-008).

[000421] Contudo, a combinação das extensões terminais 5'- e 3'-de todos os ácidos nucleicos de ligação a SDF-1 Tipo A, a fórmula genérica para a extensão terminal 5' de ácidos nucleicos de ligação a SDF-1 Tipo A é 'X_1X_2NNBV (Tipo A Fórmula-7-5'), e a fórmula genérica para a extensão terminal 3'- de ácidos nucleicos de ligação a SDF-1 Tipo A é 'BNBNX_3X_4' (Tipo A Fórmula-7-3'), onde

X_1 é 'R' ou ausente, X_2 é 'S', X_3 é 'S' e X_4 é 'Y' ou ausente;

ou

X_1 é ausente, X_2 é 'S' ou ausente, X_3 é 'S' ou ausente e X_4 é ausente.

1.2 Ácidos nucleicos de ligação de SDF-1 Tipo B

[000422] Conforme representado na Figura 3, todas as sequências

de ácidos nucleicos de ligação a SDF-1 Tipo B compreendem uma sequência de nucleotídeo de núcleo que é flanqueada por extensões terminais 5'- e 3'- que podem hibridizar um ao outro. Contudo, tal hibridização não é necessariamente dada na molécula.

[000423] Os ácidos nucleicos foram caracterizados no nível de APTÂMERO usando-se ensaios de ligação de enfraquecimento diretos e competitivos com S-SDF-1 humana biotinilatada de modo a ranqueá-las com relação a seu comportamento de ligação (Exemplo 4). Sequências selecionadas foram sintetizadas como Spiegelmers (Exemplo 3) e foram testadas usando-se a configuração natural de SDF-1 (L-SDF) em um ensaio de quimiotaxia de cultura de célula *in vitro* (Exemplo 5) e por medição de ressonância de plasmônio de superfície usando-se um instrumento de Biacore 2000 (Exemplo 6).

[000424] As sequências das caixas ou extensões definidas podem ser diferentes entre os ácidos nucleicos de ligação a SDF-1 Tipo B que influenciam a afinidade de ligação para SDF-1. Baseado na análise de ligação dos ácidos nucleicos de ligação a SDF-1 diferentes resumidas como ácidos nucleicos de ligação a SDF-1 Tipo B, a sequência de nucleotídeo de núcleo e suas sequências de nucleotídeo conforme descrita em seguida estão individualmente e mais preferivelmente em sua totalidade essencial para ligação a SDF-1:

[000425] A sequência de nucleotídeo de núcleo de todas as sequências identificadas de ácidos nucleicos de ligação a SDF-1 Tipo B compartilham a sequência GUGUGAUCUAGAUGUADWGGC-UGWUCCUAGUYAG (Tipo B Fórmula-1). Os ácidos nucleicos de ligação a SDF-1 Tipo B 193-G2-001, 193-C2-001 e 193-F2-001 que diferem em uma posição da sequência de nucleotídeo de núcleo foram analisadas em um ensaio de ligação de enfraquecimento competitivo vs. o ácido nucleico de ligação a SDF-1 Tipo B 192-A10-001 (K_D a 1,5 nM determinado em um ensaio de ligação de enfraquecimento [Figura

11], K_D a 1,0 nM determinado por medição de ressonância de plasmônio de superfície [Figura 15], IC_{50} a 0,12 nM; [Figura 12]). Cada um destes três ácidos nucleicos de ligação a SDF-1 Tipo B mostrou ligação superior para SDF-1 humana em comparação a ácido nucleico de ligação a SDF-1 Tipo A 192-A10-001 pelo que a afinidade de ligação de 193-G2-001 é tão boa quanto 193-C2-001 e 193-F2-001 (Figura 3). Os dados sugerem que a diferença na sequência de nucleotídeo da sequência nucleotídeo de núcleo de ácidos nucleicos de ligação a SDF-1 Tipo B 193-G2-001, 193-C2-001 e 193-F2-001 não tem influência na afinidade de ligação para SDF-1. Exemplarmente o ácido nucleico de ligação a SDF-1 Tipo B 193-G2-001 foi caracterizado por sua afinidade de ligação para SDF-1 humano. A constante de ligação de equilíbrio K_D foi determinada usando-se ensaio de ligação de enfraquecimento (K_D = 0,3 nM) e por medição de ressonância de plasmônio de superfície (K_D = 0,5 nM, Figura 17). A IC_{50} (concentração inibitória 50%) de 0,08 nM para 193-G2-001 foi medida usando-se um ensaio de quimiotaxia de cultura de célula in vitro. Em contraste, os ácidos nucleicos de ligação a SDF-1 Tipo B 193-B3-002, 193-H3-002, 193-E3-002 e 193-D1-002 que diferem na sequência da sequência de nucleotídeo de núcleo tem piores propriedades de ligação (Figura 3). Como resultado, ácidos nucleicos de ligação a SDF-1 Tipo B com afinidade de ligação aperfeiçoada para SDF-1 compartilham uma sequência de nucleotídeo de núcleo com a sequência GUGUGAUCUAGAUGUADUGGCUGAUCCUAGUCAGG (Tipo B Fórmula-2).

[000426] Quatro, cinco ou seis nucleotídeos fora dos seis nucleotídeos da extensão terminal 5'- de ácidos nucleicos de ligação a SDF-1 Tipo B podem hibridizar para os respectivos quatro, cinco ou seis fora dos seis nucleotídeos da extensão terminal 3' de ácidos nucleicos de ligação a SDF-1 Tipo B para formar um espira terminal.

[000427] Embora os nucleotídeos sejam variáveis em várias posições, os nucleotídeos diferentes permitem a hibridização para quatro, cinco ou seis nucleotídeos fora dos seis nucleotídeos das extensões terminais 5'- e 3'- cada. As extensões terminais 5'- e 3'- de ácidos nucleicos de ligação a SDF-1 Tipo B conforme mostrado na Figura 3 podem ser resumidas em uma fórmula genérica para a extensão terminal 5'- (Tipo B Fórmula-3-5'; 'X_1GCRWG' onde X_1 é 'A' ou ausente) e da extensão terminal 3' (Tipo B Fórmula-3-3'; 'KRYSCX_4' onde X_4 é 'U' ou ausente). Ácidos nucleicos de ligação a SDF-1 Tipo B 193-G1-002, 193-D2-002, 193-A1-002 e 193-D3-002 têm afinidades de ligação mais fracas para SDF-1, embora eles compartilhem a sequência de nucleotídeo de núcleo idêntica (Tipo B Fórmula-2) com 193-C2-001, 193-G2-001 e 193-F2-001 (Figura 3). As propriedades de ligação desfavoráveis de ácidos nucleicos de ligação a SDF-1 Tipo B 193-G1-002, 193-D2-002, 193-A1-002 e 193-D3-002 podem ser devido ao número de nucleotídeos e sequência das extensões terminais 5'- e 3'-.

[000428] Derivados truncados dos ácidos nucleicos de ligação a SDF-1 Tipo B 193-G2-001 e 193-C2-001 foram analisados em um ensaio de ligação de enfraquecimento competitivo vs. 193-G2-001 e 193-G2-012, respectivamente (Figura 4A e 4B). Estes experimentos mostram que uma redução dos seis nucleotídeos terminais (extremidade 5': AGCGUG; extremidade 3': UACGCU) de ácidos nucleicos de ligação a SDF-1 Tipo B 193-G2-001 e 193-C2-001 para cinco nucleotídeos (extremidade 5': GCGUG; extremidade 3': UACGC) conduz a moléculas com afinidade de ligação similar (193-C2-002 e 193-G2-012). A constante de dissociação de equilíbrio K_D foi determinada usando-se o ensaio de ligação de enfraquecimento (K_D = 0,3 nM, Figura 18). Um truncamento para quatro (extremidade 5': CGUG; extremidade 3': UACG; 193-C2-003) ou menos nucleotídeos (193-C2-004, 193-C2-005, 193-C2-006, 193-C2-007) resultou em uma

afinidade de ligação reduzida para SDF-1 que foi medida pelo uso do ensaio de ligação de enfraquecimento de competição (Figura 4A). A sequência de nucleotídeo dos cinco nucleotídeos terminais na extremidade 5'- e 3'-, respectivamente, tem uma influência na afinidade de ligação de ácidos nucleicos de ligação a SDF-1 Tipo B. A substituição de nucleotídeos terminais 5'-e 3'- 'GCGUG' e 'UACGC' (193-C2-002, 193-G2-12) por 'GCGCG' e 'CGCGC (193-G2-013) resultou em uma afinidade de ligação reduzida. Adicionalmente, os quatro derivados diferentes de ácido nucleico de ligação a SDF-1 Tipo B 193-G2-001 com uma espiral terminal com um comprimento de quatro nucleotídeos de emparelhamento base (193-G2-014/ -015/ -016/ -017) foram testados. Todos deles mostraram afinidade de ligação reduzida para SDF-1 (Figura 4B). Portanto, a sequência e o comprimento dos nucleotídeos terminais 5'- e 3'- são essenciais para uma ligação eficaz para SDF-1. As extensões terminais 5'- e 3'- com um comprimento de cinco e quatro nucleotídeos dos derivados de ácidos nucleicos de ligação a SDF-1 Tipo B 193-C2-003 e 193-G2-012 conforme mostrado nas Figuras 4A e 4B podem ser descritos em uma fórmula genérica para a extensão terminal 5'- ('XaSSBS', Tipo B Fórmula-4-5'), pelo que X_2 é ou ausente ou é 'G', e da extensão terminal 3'- ('BVSSX_3', Tipo B Fórmula-4-3'), e pelo que X_3 é ou ausente, ou é 'C. Conforme mostrado para ácidos nucleicos de ligação a SDF-1 Tipo B 193-G2-001 e 193-C2-01 e seus derivados 193-G2-012 e 193-C2-002, a combinação preferida de extensões terminais 5'- e 3'- são 'X_1GCGUG' (extensão terminal 5'-; Tipo B Fórmula 5-5') e 'UACGCX_4' (extensão terminal 3'-; Tipo B Fórmula 5-3'), onde X_1 é ou 'A' ou ausente e X_4 é 'U' ou ausente.

[000429] Contudo, combinando as extensões terminais 5'-e 3'- de todos ácidos nucleicos de ligação a SDF-1 Tipo B testados, a fórmula genérica para extensão terminal 5'- de ácidos nucleicos de ligação a

SDF-1 Tipo B é 'XiX_2SVNS' (Tipo B Fórmula-6-5'), e a fórmula genérica para extensão terminal 3'- ácidos nucleicos de ligação a SDF-1 Tipo B é 'BVBSX_3X_4' (Tipo B Fórmula-6-3'), onde

X_1 é 'A' ou ausente, X_2 é 'G', X_3 é 'C e X_4 é 'U' ou ausente;

ou X_1 é ausente, X_2 é 'G' ou ausente, X_3 é 'C ou ausente e X_4 é ausente.

1.3 Ácidos nucleicos de ligação de SDF-1 Tipo C

[000430] Conforme representado na Figura 5, todas as sequências de ácidos nucleicos de ligação a SDF-1 Tipo C compreendem uma sequência de nucleotídeo de núcleo que é flanqueada por extensões terminais 5'- e 3'- que podem hibridizar uma a outra. Contudo, tal hibridização não é necessariamente dada na molécula.

[000431] Os ácidos nucleicos foram caracterizados no nível de APTÂMERO usando-se ensaios de ligação de enfraquecimento competitivos diretos com S-SDF-1 humana biotinilatada de modo a ranqueá-las com relação a seu comportamento de ligação (Exemplo 4). Sequências selecionadas foram sintetizadas como Spiegelmers (Exemplo 3) e foram testadas usando-se a configuração natural de SDF-1 (L-SDF) em um ensaio de quimiotaxia de cultura de célula in vitro (Exemplo 5), e por medição de ressonância de plasmônio de superfície usando-se um instrumento Biacore 2000 (Exemplo 6).

[000432] As sequências das caixas ou extensões definidas podem ser diferentes entre os ácidos nucleicos de ligação a SDF-1 Tipo C que influenciam a afinidade de ligação para SDF-1. Baseado na análise de ligação dos ácidos nucleicos de ligação a SDF-1 diferentes resumidos como ácidos nucleicos de ligação a SDF-1 Tipo C, a sequência de nucleotídeo de núcleo e sua sequência de nucleotídeo conforme descrita em seguida estão individualmente e mais preferivelmente em sua totalidade essencial para ligação a SDF-1:

[000433] A sequência de nucleotídeo de núcleo de todas as

sequências identificadas de ácidos nucleicos de ligação a SDF-1 Tipo C compartilham a sequência GGUYAGGGCUHRX$_A$AGUCGGG (Tipo C Fórmula-1), pelo que X_A é ou ausente, ou é 'A'. Com a exceção de ácido nucleico de ligação a SDF-1 Tipo C 197-D1, a sequência de nucleotídeo de núcleo de todas as sequências identificadas de ácidos nucleicos de ligação a SDF-1 Tipo C compartilham a sequência de nucleotídeo GGUYAGGGCUHRAAGUCGG (Tipo C Fórmula-2). O ácido nucleico de ligação a SDF-1 Tipo C 197-D1 (sequência de nucleotídeo de núcleo: GGUUAGGGCUAA-AGUCGG faltando um nucleotídeo 'A' dentro da sequência de nucleotídeo de núcleo e ainda se ligando a SDF-1 deixa concluir uma sequência de nucleotídeo de núcleo alternativa GGUYAGGGCUHR-AGUCGG, Tipo C Fórmula-3). Inicialmente, todos os ácidos nucleicos de ligação a SDF-1 Tipo C conforme representado na Figura 5 foram analisados em um ensaio de ligação de enfraquecimento competitivo vs. ácidos nucleicos de ligação a SDF-1 Tipo A 192-A10-001 (K_D =1,5 nM determinada por ensaio de enfraquecimento e por medição de ressonância de plasmônio de superfícies; IC50 = 0-12 nM). Os ácidos nucleicos de ligação a SDF-1 Tipo C 191-D5-001, 197-B2, 190-A3-001, 197-Hl, 197-H3 e 197-E3 mostraram afinidades de ligação mais fracas do que 192-Al 0-001 em experimentos de competição. Afinidade de ligação mais fraca foi determinada para 191-A5, 197-B1, 197-D1, 197-H2 e 197-D2 (Figura 5). As moléculas ou derivados destas foram adicionalmente caracterizadas por ensaios de ligação de enfraquecimento competitivos, medições de ressonância de plasmônio e um ensaio de quimiotaxia in vitro. O ácido nucleico de ligação a SDF-1 Tipo C 191-D5-001 foi caracterizada por sua afinidade de ligação a SDF-1 humana onde a constante de ligação de equilíbrio K_D foi determinada por medição de ressonância de plasmônio de superfície (K_D = 0,8 nM, Figura 21). A IC_{50} (concentração inibitória 50%) de 0,2 nM para 191-

D5-001 foi medida usando-se um ensaio de quimiotaxia de cultura de célula *in vitro*. A afinidade de ligação de ácido nucleico de ligação a SDF-1 Tipo C 197-B2 para SDF-1 humana foi determinada por medição de ressonância de plasmônio de superfície (K_D = 0,9 nM), sua IC50 (concentração inibitória 50%) de 0,2 nM foi analisada em um ensaio de quimiotaxia de cultura de célula in v*itro*. Estes dados indicam que ácidos nucleicos de ligação a SDF-1 Tipo C 191-D5-001 e 197-B2 têm a afinidade de ligação similar a SDF-1 (Figura 5 e 8).

[000434] Ácido nucleico de ligação a SDF-1 Tipo C 190-A3-001 (48 nt) compreende uma extensão terminal 5'- de 17 nucleotídeos e uma extensão terminal 3'- de 12 nucleotídeos pelo que, por um lado, os quatro nucleotídeos na extremidade 5' da extensão terminal 5'-e os quatro nucleotídeos na extremidade 3'- da extensão terminal 3' pode hibridizar uma à outra para formar uma espiral terminal. Alternativamente os nucleotídeos **'UGAGA'** na extensão terminal 5'- podem hibridizar para os nucleotídeos 'UCUCA' na extensão terminal 3'- para formar uma espiral terminal. Uma redução a oito nucleotídeos da extensão terminal 5'- **('GAGAUAGG')** e para nove nucleotídeos da extensão terminal 3'- ('CUGAUUCUC') de molécula 190-A3-001 (pelo que seis fora dos oito/nove nucleotídeos da extensão terminal 5'- e 3'- podem hibridizar uma a outra) não têm uma influência na afinidade de ligação para SDF-1 (190-A3-004; Figura 6 e Figura 19). A constante de ligação de equilíbrio K_Q de 190-A3-004 foi determinada usando-se o ensaio de ligação de enfraquecimento (K_D = 4,6 nM, Figura 20) e por medição de ressonância de plasmônio de superfície (K_D = 4,7 nM). A IC_{50} (concentração inibitória 50%) de 0,1 nM para 190-A3-004 foi medida usando-se um ensaio de quimiotaxia in vitro de cultura de célula (Figura 22). Contudo, o truncamento para dois nucleotídeos na extensão terminal 5'-conduz a uma redução muito forte de afinidade de ligação (190-A3-007; Figura 6 e Figura 19).

[000435] Os ácidos nucleicos de ligação a SDF-1 Tipo C 191-D5-001, 197-B2 e 197-H1 (sequência nucleotídeo de núcleo: GGUUAGGGCUAGAAGUCGG, 197-H3/191-A5 (sequência de nucleotídeo de núcleo: GUUAGGGCUUGAAGUCGG e 197-E3/197-B1 (sequência de nucleotídeo de núcleo: GGUUAGGGCUGAAGUCGG compartilham uma sequência de nucleotídeo de núcleo quase idêntica (Tipo C fórmula-4; sequência de nucleotídeo: GGUUAGGGCURGAAGUCGG 191-D5-001, 197 B2 e 197-H1 não compartilham uma extensão terminal similar 5'- e 3'- (197-H3 e 197-E3 têm a extensão terminal idêntica 5'- e 3'- como 197-B2). Contudo, os dez respectivos (197-B2, 197-E3, 197-H3) ou nove fora dos dez (191-D5-001, 197-H1) nucleotídeos da extensão terminal 5'- podem hibridizar aos respectivos dez (197-B2, 197-E3, 197-H3) ou nove dos dez (191-D5-001, 197-H1) nucleotídeos da extensão terminal 3'- (Figura 5). Desse modo, a extensão terminal 5'- de ácidos nucleicos de ligação a SDF-1 Tipo C 197-B2, 191-D5-001, 197-H1, 197-E3 e 197-H3 conforme mencionado acima mais 191-A5, 197-B1, 197-H2, 197-D1 e 197-D2 compreendem uma sequência de nucleotídeo genérica comum de 'RKSBUSNVGR' (Tipo C Fórmula-5-5'). A extensão terminal 3'- de ácidos nucleicos de ligação a SDF-1 Tipo C 197-B2, 191-D5-001, 197-H1, 197-E3, e 197-H3 conforme mencionado acima mais 191-A5, 197-B1, 197-H2, 197-D1 e 197-D2 compreendem uma sequência de nucleotídeo genérica comum de 'YYNRCASSMY' (Tipo C Fórmula-5-3'), pelo que as extensões terminais 5' e 3'- de ácidos nucleicos de ligação a SDF-1 Tipo C 197-B2, 191-D5-001, 197-H1, 197-E3 e 197-H3, são preferidas. Estas extensões terminais 5'- e 3'- de ácidos nucleicos de ligação a SDF-1 Tipo C 197-B2, 191-D5-001, 197-HI, 197-E3 e 197-H3 podem ser resumidas na fórmula genérica 'RKSBUGSVGR' (Tipo C Fórmula-6-5'; extensão terminal 5'-) e 'YCNRCASSMY' (Tipo C Fórmula-6-3'; extensão terminal 3'-).

[000436] Derivados truncados de ácido nucleico de ligação a SDF-1 Tipo C 191-D5-001 foram construídos e testados em um ensaio de ligação de enfraquecimento competitivo vs. a molécula original 191-D5-001 (Figura 7A, Figura 7B e Figura 19). Primeiramente, o comprimento das extensões terminais 5'- e 3'- foi encurtado de dez nucleotídeos (191-D5-001) cada para sete nucleotídeos cada (191-D5-004), conforme representado na Figura 7A, pelo que nove fora dos dez (191-D5-001) ou seis fora dos sete nucleotídeos (191-D5-004) da extensão terminal 5' e da extensão terminal 3', respectivamente podem hibridizar entre si. A redução para sete nucleotídeos da extensão terminal 5'- e 3'- respectivamente (onde seis fora dos sete nucleotídeos podem hibridizar entre si) conduz a afinidade de ligação reduzida para SDF-1 (191-D5-004). As extensões terminais de ácido nucleico de ligação a SDF-1 Tipo C 191-D5-004 foram modificadas pelo que o nucleotídeo não-emparelhado 'A' dentro da extensão terminal 3'- de 191-D5-004 foi substituído por um 'C (191-D5-005). Esta modificação conduz a um aperfeiçoamento de ligação. Este derivado, ácido nucleico de ligação a SDF-1 Tipo C 191-D5-005, mostrou ligação similar a SDF-1 como 191-D5-001. Truncamento adicional da extensão terminal 5'- e 3'- para cinco nucleotídeos respectivamente conduz a uma molécula com um comprimento total de 29 nucleotídeos (191-D5-007). Devido as similaridades de 191-D5-001 e dos ácidos nucleicos de ligação a SDF-1 Tipo C 197-B2, 191-D5-001, 197-Hl, 191-A5,197-H3, 197-B1, 197-E3,197-D1,197-H2 e 197-D2, e devido aos dados mostrados para 191-D5-007, pode-se assumir que extensão terminal 5'- e 3'- pode, em princípio, ser truncada para cinco nucleotídeos, pelo que a sequência de nucleotídeo 'CGGGA' para extensão terminal 5'- e 'UCCCG' para a extensão terminal 3'-foi bem sucedidamente testado (Ácidos nucleico de ligação a SDF-1 Tipo C 191-D5-007). O ácido nucleico de ligação a

SDF-1 Tipo C 191-D5-007 surpreendentemente se liga um tanto melhor a SDF-1 do que 191-D5-001 (determinado no nível de APTÂMERO usando-se o ensaio de ligação de competição). A constante de ligação de equilíbrio K_D de 191-D5-007 foi determinada usando-se o ensaio de ligação de enfraquecimento (K_D = 2,2 nM, Figura 20) e por medição de ressonância de plasmônio de superfície (K_D = 0,8 nM, Figura 21). A IC_{50} (concentração inibitória 50%) de 0,1 nM para 191-D5-007 foi medida usando-se um ensaio de quimiotaxia in vitro de cultura de célula. Truncamento adicional de ambas extensões terminais para quatro nucleotídeos (191-D5-010, Figura7A).

[000437] Derivados adicionais de ácido nucleico de ligação a SDF-1 Tipo C 191-D5-001 (191-D5-017/ -024/ -029) suportando extensões terminais 5'- e 3'- de respectivamente quatro nucleotídeos também mostraram afinidade de ligação reduzida para SDF-1 no ensaio de ligação de enfraquecimento de competição vs. 191-D5-007 (Figura 7B). Extensões terminais alternativas 5'- e 3'- com um comprimento de respectivamente cinco nucleotídeos foram adicionalmente testadas também (191-D5-017-29a, 191-D5-017-29b, 191-D5-019-29a, 191-D5-024-29a, 191-D5-024-29b). A fórmula genérica destes para a extensão terminal 5'- é 'X_SSSSV (Tipo C Fórmula-7-5') e para a extensão 3'- é 'BSSSX_S' Tipo C Fórmula-7-3'), pelo que Xs é ausente ou S'. Duas fora das cinco variantes testadas mostraram afinidade de ligação idêntica para SDF-1 como 191-D5-007 (191-D5-024-29a, 191-D5-024-29b; Figura 7B). As sequências das extensões terminais 5'- e 3'- de derivados de 191-D5-001- que mostram a melhor afinidade de ligação para SDF-1 e compreende uma extensão terminal 5'- e 3'- de cinco nucleotídeos respectivamente (191-D5-007, 191-D5-024-29a, 191-D5-024-29b) podem ser resumidas em uma fórmula genérica (extensão terminal 5'-: 'SGGSR', Tipo C Fórmula-8-5'; extensão terminal 3'-: YSCCS', Tipo C Fórmula-8-3').

[000438] Derivados truncados de ácido nucleico de ligação a SDF-1 Tipo C 197-B2 foram analisados em um ensaio de ligação de enfraquecimento competitivo vs. a molécula original 197-B2 e 191-D5-007 (Figura 8). Usando-se o ensaio de ligação de enfraquecimento competitivo vs. 191-D5-007, foi mostrado que 197-B2 tem a mesma afinidade de ligação para SDF-1 como 191-D5-007. As extensões terminais 5'- e 3'- foram encurtadas sem perda de afinidade de ligação de dez nucleotídeos (197-B2) cada para cinco nucleotídeos cada (197-B2-005), pelo que os nucleotídeos da extensão terminal 5'- e da extensão terminal 3'- podem hibridizar completamente entre si. Se a extensão terminal 5'- ('GCGGG') e 3'- ('CCUGC') de 197-B2-005 foi substituída por 'GCCGG' (extensão terminal 5'-) e por 'CCGGC (extensão terminal 3'-) de 197-B2-006, a afinidade de ligação para SDF-1 persistiu totalmente. Devido a 197-B2 e 191-D5-001 (e seus derivados) compartilharem a sequência de nucleotídeo de núcleo idêntica (GGUUAGGGCUAGAAGUCGG) e vários derivados de 191-D5 com extensões terminais 5'- e 3'- com um comprimento de respectivamente quatro nucleotídeos foram testados, um truncamento adicional da extensão terminal 5'- e 3'-foi omitido. Dois derivados adicionais foram designados que compreende seis nucleotídeos na extremidade 5'- e 3'- (extensões terminais 5'- e 3'-), respectivamente. A afinidade de ligação para SDF-1 de ambas moléculas (197-B2-006-31a e 197-B2-006-31b) é a mesma conforme mostrado para 191-D5-007 e 197-B2-006 (Figura 8). As sequências das extensões terminais 5'- e 3'- de 197-B2 derivadas que mostram a melhor afinidade de ligação para SDF-1 e compreendem uma extensão terminal 5'- e 3'- de cinco nucleotídeos respectivamente pode ser resumido em uma fórmula genérica (extensão terminal 5'-: 'GCSGG', Tipo C Fórmula-9-5'; extensão terminal 3'-: ,CCKGC' Tipo C Fórmula-9-3').

[000439] Combinando-se as extensões preferidas 5'- e 3'- de

derivados trincados de ácidos nucleicos de ligação a SDF-1 Tipo C 191-D5-001 (extensão terminal 5'-: 'SGGSR', Tipo C Fórmula-8-5'; extensão terminal 3'-: YSCCS', Tipo C Fórmula-8-3') e 197-B2 (extensão terminal 5'-: 'GCSGG', Tipo C Fórmula-9-5'; extensão terminal 3'-: ,CCKGC, Tipo C Fórmula-9-3'), a fórmula genérica comum para a extensão terminal 5'- e 3'- é 'SSSSR' (extensão terminal 5'-, Tipo C Fórmula-10-5') e 'YSBSS' (extensão terminal 3'-: Tipo C Fórmula-10-3').

1.4 Ácidos nucleotídeos de ligação de SDF-1 adicional

[000440] Adicionalmente, outros três ácidos nucleicos de ligação a SDF-1 que não compartilham os motivos de ligação de SDF-1 de 'Tipo A', 'Tipo B' e 'Tipo C' foram identificados. Foram analisados como aptâmeros usando-se ensaio de ligação de enfraquecimento (Figura 9).

[000441] É para set compreendido que qualquer das sequências mostradas nas Figuras 1 a 9 são ácidos nucleicos de acordo com a presente invenção, incluindo aquelas formas truncadas destes, mas também incluindo aquelas formas estendidas sob a condição, contudo, que as moléculas de ácido nucleico desse modo truncadas e estendidas, respectivamente, são ainda capazes de ligação ao alvo.

Exemplo 2: 40kda-PEG e outra Modificação de Spiegelmers de ligação de SDF

[000442] De modo a prolongar o tempo de residência de plasma de Spiegelmer *in vivo,* os Spiegelmers 193-G2-012, 192-A10-008, 191-D5-007, 197-B2-006 e 197-B2-006-31b foram covalentemente acoplados a uma porção de polietileno glicol de 40 kDa (PEG) na extremidade 5'- conforme descrito na capítulo 3 (clones PEGilatados: 193-G2-012-5'-PEG, 192-A10-008-5PEG, 191-D5-007-5'PEG, 197-B2-006-5'PEG e 197-B2-006-31b-5'PEG).

[000443] As moléculas de Spiegelmer PEGilatadas foram analisadas

em um ensaio TAX *in vitro* de cultura de célula (Capítulo 5) e por medição de ressonância de plasmônio usando-se um Biacore (Capítulo 6). Todos os Spiegelmers modificados de PEG de 40 kDa são ainda capazes de inibir quimiotaxia induzida por SDF-1 e para se ligar a SDF-1 em uma faixa nanomolar baixa (Figura 23 A, 23B, 24A e Figura 24B).

[000444] Adicionalmente, Spiegelmer de ligação de SDF 192-A10-001 foi modificado com 40kDa-PEG, 30 kDa-PEG, l00 kDa de HES ou 130 kDa-de HES (clones PEGilatados: 192-A10-001-5PEG40, 192-A10-001-5TEG30, 192-A10-001-5'HES100, 192-A10-001-5'HES130; procedimento de acoplamento no capítulo 3). Conforme representado na Figura 25A e Figura 25B, nem uma porção de PEG ou uma porção de HES tem uma influência na potência de Spiegelmers para inibir quimiotaxia induzida por SDF-1.

Exemplo 3: Síntese e derivatização de Aptâmeros e Spiegelmers

3.1 SÍNTESE DE ESCALA PEQUENA

[000445] Aptâmeros e Spiegelmers foram produzidos por síntese de fase sólida com um sintetizador ABI 394 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) usando-se química de fosforamidite 2'TBDMS RNA (Damha e Ogilvie, 1993). rA(N-Bz)-, rC(Ac)-, rG(N-ibu)-, e rU-fosforamidites na configuração D- e L- foram comprados de ChemGenes, Wilmington, MA. Aptâmeros e Spiegelmers foram purificados por eletroforese de gel.

3.2 SÍNTESE DE GRANDE ESCALA MAIS MODIFICAÇÃO

[000446] Os Spiegelmers foram produzidos por síntese de fase sólida com um sintetizador AktaPilotlOO (Amersham Biosciences; General Electric Healthcare, Freiburg) usando-se química de fosforamidite 2'TBDMS RNA (Damha e Ogilvie, 1993). L-rA(N-Bz)-, L-rC(Ac)-, L-rG(N-ibu)-, e L-rU- fosforamidites foram comprados de ChemGenes (Wilmington, MA, EUA). O modificador de 5'-amino foi

comprador de American International Chemicals Inc. (Framingham, MA, EUA). A síntese dos Spiegelmers foi iniciada em L-riboG; L-riboC, L-riboA, L-riboU respectivamente modificados de tamanho de poro de CPG 1000 A (Link Technology, Glasgow, UK). Para acoplamento (15 min por ciclo), 0,3 M benziltiotetrazol (American International Chemicals Inc., Framingham, MA, EUA) em acetonitrila, e 3,5 equivalentes da respectiva solução de fosforamidite a 0,2 M em acetonitrila foi usado. Um ciclo de capeamento de oxidação foi usado. Solventes padrões adicionais e reagentes para síntese de oligonucleotídeo foram comprados de Biosolve (Valkenswaard, NL). Os spiegelmers foram sintetizados DMT-ON; após desproteção, ele foi purificado via RP-HPLC preparativa (Wincott F. e outros*,* 1995) usando-se meio de Sourcel5RPC (Amersham). O grupo 5'DMT foi removido com 80% de ácido acético (90 min a temperatura ambiente). Subsequentemente, solução de NaOAc a 2M aquosa foi adicionada e o Spiegelmer foi desalgado por filtração de fluxo tangencial usando-se 5 K de membrana de celulose regenerada (Millipore, Bedford, MA).

3.3 PEGILAÇÃO

[000447] De modo a prolongar o tempo de residência de plasma de spiegelmer *in vivo,* os spiegelmers foram covalentemente acoplados a uma porção de polietileno glicol (PEG) de 40 kDa na extremidade 5'.

[000448] Para PEGilação (para detalhes técnicos do método para PEGilação, ver pedido de patente Europeu EP 1 306 382), o Spiegelmerd modificado de 5'-amino purificado foi dissolvido em uma mistura de H_2O (2,5 ml), DMF (5 ml), e tampão A (5 ml; preparado por mistura de ácido cítrico • H2O [7 g], ácido bórico [3,54 g], ácido fosfórico [2,26 ml], e NaOH a 1 M [343 ml] e adição de água a um volume final de 1 1; pH = 8,4 foi ajustado com HC1 a 1 M).

[000449] O pH da solução de Spiegelmer foi trazido para 8,4 com NaOH a 1 M. Em seguida, 40 kDa PEG-NHS éster (Nektar

Therapeutics, Huntsville, AL) foi adicionado a 37°C a cada 30 min em seis porções de 0,25 equivalentes até que um rendimento máximo de 75 a 85% foi alcançado. O pH da mistura de reação foi mantido a 8 – 8,5 com NaOH a 1 M durante adição ao PEG-NHS éster.

[000450] A mistura de reação foi misturada com 4 ml de solução de uréia (a 8 M), e 4 ml de tampão B (0,1 M acetato de trietilamônia em H2O) e aquecida a 95 °C por 15 min. O Spiegelmer PEGilatado foi então purificado por RP-HPLC com meio de Source 15RPC (Amersham), usando-se um gradiente de acetonitrila (tampão B; tampão C: 0,1 M acetato de trietilamônia em acetonitrila). PEG em excesso eluído a 5% de tampão C, Spiegelmer PEGilatado a 10 - 15% de tampão C. Frações de produto com uma pureza de >95% (conforme avaliada por HPLC) foram combinadas e misturadas com 40 ml de NaOAC 3 M. O Spiegelmer PEGilatado foi desalgado por filtração de fluxo tangencial (5 K de membrana de celulose regenerada, Millipore, Bedford MA).

3.4 HESilação

[000451] De modo a prolongar o tempo de residência de plasma de Spiegelmer *in vivo,* os Spiegelmers foram covalentemente acoplados a Hidroxil Etil Amido (HES) de vários pesos moleculares de > 130 kDa e grau de substituição > 0,5. A extremidade 5' do Spiegelmer é o local preferido para conjugação.

[000452] Para HESilação (para detalhes técnicos do método para Hesilação de ácidos nucleicos, ver Pedido de Patente DE 101 12 825 Al, e para D/L-ácidos nucleicos PCT WO 02/080979 A2), o Spiegelmer de 5'-amino purificado foi dissolvido em bicarbonato de sódio (0,3M, 1 ml) e o pH é ajustado para 8,5.

[000453] Com relação ao Spiegelmer, um excesso de 5 vezes do ácido livre de HES (3,3 mmols, Supramol, Rosbach, Alemanha) e di(N-succinimidil) carbonato (3,3 mmols) foram adicionados a N,N-

dimetilformamida (1 ml) para produzir uma solução do éster N-hidroxisuccimida ativado de HES. Para dissolver todos os reagentes, a mistura foi agitada brevemente a 60°C, resfriada a 25 °C e então agitada por 1,5 horas a 25°C. A solução de Spiegelmer foi adicionada à solução de HES ativado, e a mistura resultante foi agitada a 25°C e pH 8,5. A reação foi monitorada por IEX-HPLC analítica. Tipicamente a conjugação procede para >75 % dentro de 1 hora.

[000454] Para purificação de IEX-HPLC via meio de Source 15Q (GE, Freiburg, Alemanha), a mistura de reação foi misturada com uma quantidade de 10 vezes de tampão A (1 mM de EDTA, 25 mM de Tris, 10 mM de NaC104 em água/acetonitrila 9:1, pH 4). Excesso de HES elui a 5% de tampão A (1 mM de EDTA, 25 mM de Tris, 500 mM de NaClO4 em água/acetonitrila 9:1, pH 4), onde o conjugado HES-Spiegelmer elui a 20-30% de tampão B. As frações de produto com uma pureza de >95% (conforme avaliadas por HPLC) foram combinadas e desalgadas por filtração de fluxo tangencial (5 K de membrana de celulose regenerada, Millipore, Bedford MA).

Exemplo 4: Determinação de constantes de ligação (Ensaio de ligação de enfraquecimento)

4.1 Ensaio de ligação de enfraquecimento direto

[000455] A afinidade de aptâmeros a D-SDF-1 humana biotinilatada foi medida em formato de ensaio de ligação de enfraquecimento a 37°C. Aptâmeros foram 5'-fosfato etiquetados por T4 polinucleotídeo quinase (Invitrogen, Karlsruhe, Alemanha) usando-se [γ-^{32}P]-ATP etiquetado (Hartmann Analytic, Braunschweig, Alemanha). A radioatividade específica de aptâmeros etiquetados foi 200.000 – 800.000 cpm/pmol. Aptâmeros foram incubados após de- e renaturação a 10, 20, 30 ou 40 pM de concentração a 37°C em tampão de seleção (Tris-HCl a 20 mM pH 7,4; NaCl a 137 mM; KC1 a 5 mM; $MgCl_2$ a 1 mM; CaCb a 1 mM; 0,1% [p/vol] Tween-20), junto

com quantidades variantes de D-SDF-1 humana biotinilatada por 4 - 12 horas de modo a alcançar equilíbrio a baixas concentrações. O tampão de seleção foi suplementado com 10 µg/ml de albumina de soro humana (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha), e 10 µg/ml de RNA de levedura (Ambion, Austin, EUA) de modo a prevenir adsorção de co-participantes de ligação com superfícies de artigo de plástico ou a matriz de imobilização. A faixa de concentração de D-SDF-1 humana biotinilatada foi ajustada de 8 pM para 100 nM; volume de reação total foi 1 ml. Peptídeo e complexos de peptídeo-APTÂMERO foram imobilizados em 1,5 µl de partículas de Streptavidin Ultralink Plus (Pierce Biotechnology, Rockford, EUA) que foram pré-equilibrados com tampão de seleção e resuspensos em um volume total de 6 µl. As partículas foram mantidas em suspensão por 30 min na respectiva temperatura em um termomisturador. A radioatividade imobilizada foi quantificada em um contador de cintilação após destacamento do sobrenadante e lavagens apropriadas. A percentagem de ligação foi plotada contra a concentração de D-SDF-1 humana biotinilatada e constantes de dissociação foram obtidas pelo uso de algoritmos de software (GRAFIT; Erithacus Software; Surrey U.K.) assumindo-se uma estequiometria de 1:1.

4.2 Ensaio de ligação de enfraquecimento competitivo

[000456] De modo a comparar aptâmeros de ligação de D-SDF-1 diferentes, um ensaio de ranqueamento competitivo foi realizado. Para esta proposta, o APTÂMERO mais próximo disponível foi radioativamente etiquetado (vide acima) e servidos como referência. Após de- e renaturação, ele foi incubado a 37°C com D-SDF-1 humana biotinilatada em 1 ml de tampão de seleção em condições que resultam em ao redor de 5 -10% de ligação ao peptídeo após imobilização e lavagem em NeutrAvidin agarose ou Streptavidin Ultralink Plus (ambos de Pierce) sem competição. Um excesso de

variantes de APTÂMERO D-RNA de- e renaturado não-etiquetado foi adicionado a concentrações diferentes (por exemplo 2, 10, e 50 nM) com o APTÂMERO de referência etiquetado para reações de ligação paralelas. Os aptâmeros a serem testados competem com o APTÂMERO de referência para ligação-alvo, diminuindo, desse modo, o sinal de ligação em dependência de suas características de ligação. O APTÂMERO que foi encontrado mais ativo neste ensaio pode então servir como uma nova referência para análise comparativa de variantes de APTÂMERO adicionais.

Exemplo 5: Análise da inibição de quimiotaxia induzida por SDF por Spiegelmers de ligação de SDF-1

[000457] Células de leucemia de célula T humana de Jurkat (obtidas de DSMZ, Braunschweig) foram cultivadas a 37°C e 5% de CO_2 em meio RPMI 1640 com Glutamax (Invitrogen, Karlsruhe, Alemanha) que contém 10% de soro bovino fetal, 100 unidades/ml penicilina e 100 µg/ml de estreptomicin (Invitrogen, Karlsruhe, Alemanha). Um dia antes do experimento, as células foram semeadas em um novo frasco com uma densidade de 0,3 x 10^6/ml (9 x 10^6/30 ml) em meio padrão (Invitrogen, Karlsruhe, Alemanha).

[000458] Para o experimento, as células foram centrifugadas (5 min a 300g), resuspensas, contadas e lavadas uma vez com 15 ml de HBH (Solução de sal equilibrada de Hanks contendo 1 mg/ml de albumina de soro bovino e 20 mM de HEPES; Invitrogen, Karlsruhe, Alemanha). Em seguida as células foram resuspensas a 3 x 10^6/ml ou 1,33 x 10^6/ml, dependendo do tipo de placa de filtro usada. As células foram então permitidas migrarem através de membranas de poro das placas de filtro por várias horas para uma solução contendo SDF-1 e várias quantidades de Spiegelmer. Quaisquer placas Transwell e insertos membrana porosa de Policarbonato, diâmetro de poro de 5 µm (Corning; 3421) ou placas MultiScreen MIC (Millipore, MAMIC5S10)

foram usados.

5.1 Protocolo para placas Transwell

[000459] As soluções de estimulação (SDF-1 + várias concentrações de Spiegelmer) foram compostas em 600 µl de HBH nos compartimentos inferiores das placas Transwell e incubadas por 20-30 min. Todas as condições foram compostas pelo menos duas vezes. Os insertos foram transferidos para as cavidades contendo as soluções de estimulação e 100 µl de uma suspensão de célula com $3x10^6$/ml foram adicionados aos insertos (3 x 10^5 células/cavidade). As células foram então permitidas migrarem por 3 horas a 37°C.

[000460] Em seguida, os insertos foram removidos e 60 µl de solução de operação de resazurin (Sigma, Deisenhofen, Alemanha) (440 µM em PBS; Biochrom, Berlin, Alemanha) foram adicionados às cavidades (também para calibração de cavidades). As placas foram então incubadas a 37°C por 2,5 a 3 h. Após incubação, 200 µl de cada cavidade foram transferidos para uma placa negra de 96 cavidades. A medição dos sinais de fluorescência foi feita a 544 nm (excitação) e 590 nm (emissão) em uma leitora de placa de multidetecção Fluostar Optima (BMG, Offenburg, Alemanha).

5.2 Protocolo para placas de Millipore MultiScreen

[000461] As soluções de estimulação (SDF-1 + várias concentrações de Spiegelmer) foram compostas como soluções 10X em uma placa de 96 tubos de baixo perfil de 0,2 ml. 135 µl de HBH foram pipetados nos compartimentos inferiores da placa *MultiScreen* e 15 µl das soluções de estimulação foram adicionados. Todas as condições foram compostas como triplicatas. Após 20 a 30 min, a placa de filtro foi inserida na placa contendo as soluções de estimulação e 75 µl de uma suspensão de célula com 1,33 x 10^6/ml foram adicionados às cavidades da placa de filtro (1 x 10^5 células/cavidade). As células foram então permitidas migrarem por 3 horas a 37°C.

[000462] Em seguida, a placa de inserto é removida e 20 µl de solução de operação de resazurin (440 µM em PBS) são adicionados às cavidades inferiores. As placas foram então incubadas a 37°C por 2,5 a 3 h. Após incubação, l00 µl de cada cavidade foram transferidos para uma placa negra de 96 cavidades. A medição dos sinais de fluorescência foi realizada conforme descrito acima.

5.3 Avaliação

[000463] Para avaliação, os valores de fluorescência foram corrigidos para fluorescência antecedente (nenhuma célula na cavidade). Em seguida a diferença entre condições experimentais com e sem SDF-1 foi calculada. O valor para a amostra sem Spiegelmer (SDF-1 somente) foi ajustado 100% e os valores para as amostras com Spiegelmer foram calculados como porcentagem destes. Para uma curva de resposta de dose, os valores por cento foram plotados contra concentração de Spiegelmer e o valor IC_{50} (concentração de Spiegelmer em que 50% da atividade sem Spiegelmer está presente) foi determinado graficamente a partir da curva resultante.

5.4 Resultados

5.4.1 Estimulação dependente de dose de células de Jurkat por SDF-1 humana

[000464] SDF-1 humana foi verificada estimular migração de células de Jurkat em uma maneira dependente da dose, com estimulação meio-máxima a cerca de 0,3 nM (Figura 11).

5.4.2 Inibição dependente de dose de quimiotaxia induzida por SDF-1 humana por Spiegelmers de ligação de SDF-1

[000465] Quando as células foram permitidas migrarem para uma solução contendo SDF-1 humana mais concentrações aumentadas de Spiegelmers de ligação de SDF-1, a inibição dependente da dose foi observada. O respectivo IC50s dos Spiegelmers testados são especificados no Exemplo 1. Quando um Spiegelmer de Controle não-

específico foi usado ao invés de Spiegelmers de ligação de SDF-1, nenhum efeito inibitório foi observado até 1 μM (Figura 26).

5.4.3 Inibição dependente d dose de quimiotaxia induzida por SDF-1 de camundongo por Spiegelmers de ligação de SDF-1

[000466] SDF-1 é bem conservada através da espécie: SDF-1 de camundongo difere de SDF-1 humana em um aminoácido (isoleucina na posição 18 ao invés de valina). SDF-1 de murina pode estimular quimiotaxia de células de Jurkat (Figura 27) e esta ação foi verificada ser inibida por Spiegelmers 192-A10-001 e 191-D5-007-5'-PEG com a mesma potência como no caso de SDF-1 humana (Figura 28).

Exemplo 6: Análise de ligação por Medição de ressonância de plasmônio de superfície

[000467] O instrumento Biacore 2000 (Biacore AB, Uppsala, Suécia) foi usado para analisar ligação de Spiegelmers a SDF-1 α humana. Quando acoplamento de SDF-1 α estava para ser alcançado via grupos de amina, SDF-1 α foi dializada contra água por 1 - 2 horas (Millipore VSWP ésteres de celulose misturados; tamanho de poro, 0,025 μM) para remover aminas de interferência. Chips sensor CM4 (Biacore AB, Uppsala, Suécia) foram ativado antes de acoplamento de proteína por uma injeção de 35 μl de uma diluição 1:1 de NHS a 0,4 M e EDC a 0,1 M a um fluxo de 5 μl/min. Quimiocina foi então injetada em concentrações de 0,1-1,5 μg/ml a um fluxo de 2 μl/min até que a resposta do instrumento estava na faixa de 1000-2000 RU (unidades relativas). Os NHS ésteres não-reagidos foram desativados por injeção de 35 μl de solução de hidrocloreto de etanolamina (pH 8,5) a um fluxo de 5 μl/min. O chip sensor foi limpo duas vezes com tampão de ligação e equilibrado a 10 μl/min por 1 - 2 horas até que a linha base pareceu estável. Para todas as proteínas, os parâmetros cinéticos e constantes de dissociação foram avaliados por uma série de injeções de Spiegelmer a concentrações de 1000, 500, 250, 125, 62,5, 31,25, e 0

nM em tampão de seleção (Tris-HCl a 20 mM; NaCl a 137 mM; KC1 a 5 mM; $CaCl_2$ a 1 mM; $MgCl_2$ a 1 mM; Tween20, 0,1% [p/v]; pH 7,4). Em todos os experimentos, a análise foi realizada a 37°C usando-se o comando Kinject definindo um tempo de associação de 180 e um tempo de dissociação de 360 segundos a um fluxo de µl/min. A análise de dados e cálculo de constantes de dissociação (K_D) foi feita com o software BIAevaluation 3.0 (BIACORE AB, Uppsala, Suécia) usando o algoritmo de ajuste estequiométrico 1:1 de Langmuir.

Exemplo 7: Inibição de [^{125}J]-ligação de SDF-l a células de expressão CXCR4 por Spiegelmers de ligação de SDFF-1

7.1 Método

[000468] Um clone de cDNA que codifica para receptor de CXCR4 humano (NM_003467.2) foi comprador de OriGene Technologies (Rockville, MD) e clonado no vetor pCR3.1 (Invitrogen, Karlsruhe, Alemanha). O vetor resultante foi transfectado em células CHO-K1 (DSMZ, Braunschweig, Alemanha) usando-se Lipofectamin 2000 (Invitrogen) e linhas de célula de expressão estáveis foram selecionadas por tratamento com geneticin. Expressão de receptores foi verificada por RT-PCR.

[000469] Para ensaios de ligação, células expressando CXCR4 foram semeadas em placas de 24 cavidades revestida com polilisina a uma densidade de célula de 1 x 10^5 células/cavidade e cultivadas durante a noite a 37°C e 5% de CO_2 em meio de CHO-Ultra (Cambrex, Venders, Belgium) contendo 50 unidades/ml de penicilina, 50 µg/ml de streptomicin e 0,5 mg/ml de geneticin.

[000470] Para o experimento de ligação, o meio foi removido e as células foram lavadas uma vez com solução de sal equilibrada de Hanks, adicionalmente contendo 20 mM de HEPES, 1 mg/ml de albumina de soro bovino, 0,1 mg/ml de bacitracin (HBB). Em seguida as células foram incubadas em 0,2 ml de HBB por 1 hora à

temperatura ambiente junto com 50 pM [^{125}J]-SDF-1 (PerkinElmer, Rodgau, Alemanha) e concentrações variadas de Spiegelmer.

[000471] Ligação não-específica foi determinada por adição de SDF-1 humana não-etiquetada (R&D Systems, Wiesbaden, Alemanha) a uma concentração final de 0,5 µM para várias cavidades.

[000472] Após o período de incubação, o sobrenadante foi removido e as cavidades foram lavadas 3 vezes com HBB frio. Em seguida as células foram lisadas com 0,1 ml 0,1 M de NaOH. Lisatos foram transferidos em frascos de cintilação e após adição de 4 ml de coquetel cintilação líquida (Zinsser, Frankfurt, Alemanha) foram contados em um contador de cintilação Beckman LS6500.

[000473] Desde que os valores para ligação não-específica (ligação na presença de alta quantidade de SDF-1 não-etiquetada) foram um tanto mais altos do que os valores para ligação total na presença de altas concentrações (500 pM) de Spiegelmer, a diferença entre ligação máxima ("máx") e ligação na presença de 500 pM de Spiegelmer foi usado para cálculo de valores de IC_{50}.

7.2 Resultados

[000474] Plotagem de [125J]-SDF-1 ligada contra concentração de Spiegelmer revelou que ligação de SDF-1 pode ser bloqueada por Spiegelmer 192-A10-001 com uma IC_{50} de cerca de 60 pM (Figura 29).

Exemplo 8: Inibição de ativação de MAP-quinase induzida por SDF-1 por Spiegelmers de ligação de SDF

8.1 Método

[000475] Células CHO de expressão de CXCR4 foram semeadas em placas de 6 cavidades a uma densidade de 0,5 x 10^6 células/cavidade e cultivadas por cerca de três horas a 37°C e 5% de CO2 em meio de CHO-Ultra (Cambrex, Venders, Bélgica) contendo 50 unidades/ml de penicilina, 50 ng/ml de streptomicin e 0,5 mg/ml de geneticin. Após fixação de sino, o meio foi removido e substituído por meio de Ham's

F12 contendo 50 unidades/ml de penicilina, 50 µg/ml de streptomicin. As células foram em seguida incubadas durante a noite a 37°C e 5% de CO_2. Três horas antes, a estimulação do meio foi substituída uma vez mais por meio de Ham's F12. As células foram estimuladas com 1 nM de SDF-1 humana e várias quantidades de Spiegelmer por 5 ou 10 minutos. Em seguida, o meio foi removido e as células foram rapidamente lavadas uma vez com 1 ml de salina tamponada com fosfato frio (PBS), seguido por lisis com tampão de amostra de SDS (Tris/HCl, pH 6,8, 62,5 mM de glicerol, 10% de SDS, 2% de bromofenolblue, 0,01 % de beta-mercaptoetanol, 5%). 1 µl 0,5 µ/µl de Benzonase (Merck, Darmstadt, Alemanha) foi adicionado a cada cavidade e após incubação por 5 a 10 min à temperatura ambiente, lisatos foram transferidos para tubos Eppendorf, incubados a 95°C por 5 min e armazenados a -20°C até análise adicional.

[000476] 25 µl dos lisatos foram separados em 10% de géis de SDS-poliacrilamida de desnaturação. Proteínas foram então transferidas por eletrotransferência em membranas de nitrocelulose HybondECL (Amersham/GE Healthcare, Munich, Alemanha). Após transferência, as membranas foram coradas com vermelho de Ponceau (0,2% em 3% de ácido tricloroacético) para controle de carregamento de proteína e transferência e em seguida bloqueadas por incubação em TBS-T (salina Tris-tamponada (20 mM de Tris/HCl, pH 7,6, 137 mM de NaCl) com 0,1% de Tween 20) contendo 10% de leite seco sem gordura a 2 - 8°C durante a noite.

[000477] A membrana foi em seguida incubada com um anticorpo de coelho anti-Phospho-MAP-quinase (1:1000 em 10% de leite em TBS-T) por 2 horas à temperatura ambiente. Após lavagem três vezes por 5 min com TBS-T, a membrana foi incubada com conjugado anti-coelho-IgG-HRP (1:2000 em 10% de leite em TBS-T) por 1 hora à temperatura ambiente. Em seguida a membrana foi novamente lavada

três vezes por 5 min com TBS-T, seguido por incubação por 1 min em reagente quimioluminescente LumiGlo^{R}. Luminescência foi detectada por exposição a filmes de quimioluminescência Hyperfilm ECL (Amersham/GE Healthcare) por 30 segundos a 2 minutos. Os anticorpos e o reagente de detecção de luminescência foram componentes do kit PhosphoPlus p44/42 MAP Quinase (Thr202/Tyr204) Anticorpo de Cell Signaling Technology (New England Biolabs, Frankfurt a.M., alemanha)

8.2 Resultados

[000478] Estimulação de células que expressam CXCR4 com 1 nM de SDF-1 humana por 5 min conduziu a uma estimulação profunda de MAP-quinase, indicada por um aumento na intensidade da faixa que reflete MAP-quinase ativada. Esta ativação de MAP-quinase pode ser inibida dependentemente da dose por Spiegelmer 191-A10-001 (Figura 30).

Exemplo 9: Análise funcional de Spiegelmer de ligação de SDF-1 humana 193-G2-012-5'-PEG em um ensaio de germinação de anel aórtico

[000479] Para testar se Spiegelmer de ligação de SDF-1 humana 193-G2-012-5'-PEG é funcional também em um ensaio de cultura de órgão de angiogênese padrão, ensaios de germinação de anel aórtico foram realizados. Este ensaio, em que o comprimento e abundância de extensões similares a vaso a partir dos explantes são avaliados, tem se tornado o modelo de cultura de órgão mais amplamente usado para angiogênese (Auerbach e outros. 2003). Tem já sido mostrado que SDF-1 induz germinação neste tipo de ensaio (Salcedo e outros. 1999).

[000480] Aortas de rato foram cortadas em anéis, embutidas em uma matriz de colágeno e incubados com SDF-1 e SDF-1 mais Spiegelmer de ligação de SDF-1 humana 193-G2-012-5'-PEG ou SDF mais um

Spiegelmer de Controle PEGilatado não-funcional que não se liga a SDF-1. Após 6 a 7 dias, germinação (isto é protuberância de células endoteliais) foi analisada por tomada de fotografias e determinando-se um índice de germinação.

9.1 Método

[000481] Aortas de ratos machos foram obtidas de Bagheri Life sciences (Berlin, Alemanha). As aortas foram preparadas recentemente e transportadas em gelo em Meio MCDB 131 (Invitrogen, Karlsruhe, Alemanha) contendo 50 unidades/ml de penicilina, 50 µg/ml de estreptomicina (ambos Invitrogen, Karlsruhe, vjerrnany) e 2,5 µm/ml de fungizone (Cambrex, EUA).

[000482] Para um experimento, uma aorta simples foi transferida para um prato de cultura de célula junto com o meio e tecido conectivo residual foi removido. Em seguida, a aorta foi cortada com um scalpe em anéis de cerca de 1 a 2 mm de comprimento. Os anéis foram lavados intensivamente (pelo menos cinco vezes) em Meio 199 (Invitrogen, Karlsruhe, Alemanha) e, em seguida, colocados em cavidades de uma placa de 24 cavidades, contendo 450 µl de solução de colágeno por cavidade. Esta solução de colágeno foi preparada por mistura de 9 ml de colágeno de rabo de rato (3 mg/ml em 0,1% de ácido acético; Sigma, Deisenhofen, Alemanha) com 1,12 ml de 10X Meio 199 (Invitrogen, Karlsruhe, Alemanha), 1,12 ml de 10X Colágeno-tampão (0,05 N NaOH, 200 mM de HEPES, 260 mM de $NaHC0_3$) e 0,6 ml 200 mM de Glutamin. Os anéis foram orientados tal que as bordas pregueadas eram perpendiculares ao fundo da cavidade. O colágeno foi permitido solidificar por incubação das placas por pelo menos uma hora a 37°C. Em seguida, 1 ml de meio de MCDB131 com adições (SDF-1 e Spiegelmers) foi adicionado à cavidade. Os anéis foram então incubados a 37°C por seis a sete dias. Como controle para germinação, os experimentos foram adicionalmente feitos com VEGF

(Fator de crescimento endotelial vascular).

[000483] A germinação foi documentada por tomada de fotografias com uma câmera digital. Em alguns casos os anéis foram fixados pela adição de 1 ml 10% de paraformaldeído e armazenados a 2-8°C para documentação adicional. As fotografias foram analisadas com o software de processamento Scion Image. Após calibração com a ajuda de uma fotografia tomada de um micrômetro de estágio, uma linha foi estirada em uma distância de 0,33 mm de uma borda de um anel. Um histograma gráfico ao longo desta linha foi gerado pelo software, histogramas foram impressos e picos (representando germinações que atravessam a linha) foram contados. Este número foi tomado como índice de germinação. 4 a 5 anéis por condição foram avaliados. Análise estatística foi realizada com WinSTAT para Excel.

9.2 Resultados

[000484] Pode ser demonstrado que SDF-1 induz germinação e que este efeito pode ser bloqueado com Spiegelmer de ligação de SDF-1 humana 193-G2-012-5'-PEG. Nenhum bloqueio de germinação induzida por SDF-1 foi observado pelo Spiegelmer de Controle PEGilatado não-funcional (Figuras 31 e 32).

Exemplo 10: Mobilização de células-tronco hematopoiéticas/células progenitoras hematopoiéticas (KSC/KPC) em camundongos por uma injeção intravenosa simples de NOX-A12 que foi derivada com 30 ou 40 kDa PEG

10.1 Substâncias de teste e esquema de administração

[000485] Camundongos foram injetados i.v. com 13,4 mg/kg de Spiegelmer de ligação de SDF-1 NOX-A12-JE40 (SEQ.ID. 132), Spiegelmer de ligação de SDF-1 NOX-A12-NO30 (SEQ.ID. 242) ou Spiegelmer de controle revNOX-A12 (SEQ.ID. 243) que não têm atividade de ligação a SDF-1. Um, seis, 24 ou 48 h após a injeção [5 camundongos por substância e ponto de tempo] os animais foram

terminados e sangue foi obtido. Os grupos de controle foram injetados com veículo (5 % de glicose), AMD-3100 (Sigma, France, 5 mg/kg s.c.) ou fator de estimulação de Granulócito-colônia (G-CSF, Neupogen) (2,5 µg/camundongo/injeção, toda 12 h). Terminação de animais foi feita nos mesmos pontos de tempo conforme acima (ver Figura 33). Para o grupo G-CSF (Neupogen): Devido ao esquema de injeção de uma injeção toda 12 h, os animais que são terminados após uma, e seis horas têm, portanto, recebido somente uma injeção, o grupo terminado em 24 h recebeu 2 injeções (a 0 e 12 h), o grupo terminado em 48 h recebeu quatro injeções (a 0, 12, 24 e 36 h) (ver Figura 33). Contagens de célula de sangue foram determinadas em um hemocitômetro.

10.2 Detecção de HSC/HPC

[000486] Cinquenta (50) µl de sangue total foram primeiro incubados com reagente de bloqueio FcR (Ref 130-092-575, Miltenyi Biotec, Paris, França) em tampão de transferência (PBS [Ref 17-516F, Lonza], 0,2% de BSA [Ref A7030, Sigma], 0,02% de NaN3 [Ref S2002, Sigma] e, em seguida, incubados à temperatura ambiente no escuro por 30 min com FITC conjugado anti-CD117 e PE conjugado anti-Ly-6A/E anticorpos, ou com isotipos correspondentes (conforme descrito na Tabela abaixo).

Antígenos	Clone	Isotipo	Fluorocromo	Ref	Fonte	Quanti-dade
CD117	2B8	IgQ_{2b}	FITC	553354	BD Biosciences	1 ng
CD117 isotipo de controle		IgG_{2b}	FITC	553998	BD Biosciences	1 ng
Ly-6A/E	D7	IgG_{2a}	PE	553108	BD Biosciences	1 ng
Ly-6A/E isotipo de controle	Tipo	IgG_{2a}	PE	553930	BD Biosciences	1 ng

[000487] Células de sangue vermelhas foram lisadas usando-se o

procedimento "Fixar e Lisar". Brevemente, tampão "Fixar e Lisar" será preparado por adição de 25 µL de solução de IOTest 3 (10X de Solução Fixadora [Ref A07800, Beckman Coulter, Villepinte, France]) a 1 mL de VersaLyse [Ref A09777, Beckman Coulter] e 1 mL da mistura foi adicionado às células marcadas. Após serem centrifugadas e incubadas por 10 min no escuro à temperatura ambiente, as células foram centrifugadas e lavadas uma vez com 3 mL de tampão de transferência e ressuspensas em 1 mL de solução de microesferas de referência (PKH26, Ref P7458, 220.000 esferas/ml, Sigma, ½ diluídas em tampão de transferência). As amostras foram armazenadas em gelo protegidas de exposição de luz até análise de FACS.

[000488] A fluorescência de superfície das células foi analisada com um aparelho citômetro de fluxo (FACS, CyFlow® space) usando-se uma excitação de laser de comprimento de onda de 488 nm. Um total de 10.000 eventos foram coletados para cada amostra.

10.3 Cálculo de números de célula absolutos por µL

[000489] O volume das amostras de sangue foi 50 µL. No final do procedimento de preparação, as células de sangue brancas (que estavam contidas nos 50 µL de amostra de sangue) foram ressuspensas em 0,75 mL de uma solução de microesfera (obtida por uma 1/2 diluição de uma solução de estoque contendo 220.000 esferas em 1 mL). O número de células por mL desta última solução é: (CN/BN) x (220000/2), e o número total de células é: (CN/BN) x (220000/2) x (0.75/1), onde CN é o número de contagens para células e BN é o número de contagens para microesferas.

[000490] Portanto, este número total de células foi contido nos 50 µl de sangue e o número absoluto de células (ACN) per µl de sangue é: (CN/BN) x (220000/2) x (0,75/1) x (1/50).

10.4 Determinação de unidades de formação de colônia (CFU)

[000491] Somente sangue daqueles pontos de tempo com a

quantidade máxima de células progenitoras hematopoiéticas (HPC)/ células-tronco hematopoiéticas (HSC) foi escolhido para ser individualizado para ensaios de CFU (um ponto de tempo idêntico para todos os camundongos por substância). A depleção de células de sangue vermelhas (RBCs) de amostras de sangue periférico normal foi realizada pela adição de 10 volumes l0x de tampão lysis (0,8% de NH4C1 com 0,1 mM de EDTA) (ref 07800, StemCell Technologies) para sangue periférico, misturando por inversão do tubo 3-4 vezes e incubação em gelo por 5-15 minutos. Após centrifugação por 7 min a 1.200 rpm, células de sangue brancas (WBCs) foram lavadas duas vezes com Meio Iscove's Modified Dulbecco's (IMDM) contendo 2% de soro bovino fetal inativado por calor (FBS, Ref DE14-802F, Lonza). WBCs nucleados foram contados usando-se um hemacitômetro (contador MS9-5 (Melet Schloesing, Osny, França)) após serem 1/20 diluídos em 3% de ácido acético com azul de metileno (Ref 07060, StemCell Technologies).

[000492] As células foram colocadas em triplicata em 0,9% de metilcelulose contendo IMDM (Ref MethoCult® M03434, StemCell Technologies) já contendo 2% de FBS inativado por calor, fator de célula-tronco de camundongo recombinante mouse (rm) (SCF, crescimento de células-tronco e progenitores de mieloide e linfoide), rm IL-3 e rh IL-6 (crescimento de progenitores de mieloide precoces de todas as linhagens), e eritropoietin humana recombinante (rh EPO, crescimento de progenitores eritroides). Brevemente, WBCs concentrados 10 vezes (0,4 ml) foram diluídos em metilcelulose completa IMDM (concentração final a ser definida durante o experimento de validação), através de todo centrifugado e deixado assentar por 2-5 minutos para permitir que bolhas se dissipem antes da dispensa. 1,1 ml de meio de metilcelulose contendo mistura de células foram dispensados usando-se uma seringa de trava luer e uma

agulha de extremidade rombuda 16G (Ref 28110, StemCell Technologies) para cada de três pratos de cultura de 35 mm (Ref 27150, StemCell Technologies). Os pratos foram brandamente inclinados e girados para distribuir metilcelulose constantemente. Pratos grandes com uma água estéril adicional contendo prato de 35 mm foram usados para manter pratos de 35 mm durante incubação a 37°C, 5% de CO2, com 95% de umidade por 7 a 12 dias. No final da incubação, colônias foram manualmente contadas como BFU-E (Ruptura-unidade de formação-eritroide), CFU-GM (Colônia-unidade de formação-granulócito e/ou macrófago) e CFU-GEMM (Colônia-unidade de formação-granulócito, eritroide, macrófago e megacariócito) usando-se um microscópio invertido e um prato de classificação de 60 mm (Ref 27500, StemCell Technologies). O número de colônias foi normalizado para CFU/mL sangue.

10.5 Resultados de citometria de fluxo

[000493] Spiegelmer de ligação de SDF-1 NOX-A12-JE40 e NOX-A12-NO30 conduziu a um aumento marcado de HPC/HSC conforme medido por marcação dupla de CD117 e Ly-6 A/E na análise de FACS (ver Figura 34). O pico foi observado 6 h após administração de Spiegelmer. NOX-A12-JE40 conduziu a liberação de células 700 $CD117^{+}Ly\text{-}6\ A/E^{+}$ por µL. Spiegelmer de ligação de SDF-1 NOX-A12-NO30 liberou 300 células de $CD117^{+}Ly\text{-}6\ A/E^{+}$ por µL de sangue. No grupo de veículo, 100 células $CD117^{+}Ly\text{-}6\ A/E^{+}$ por µL de sangue foram contadas. Um efeito de mobilização de HSC/HPC de G-CSF foi visto nos camundongos que tinham recebido 4 injeções de G-CSF e foram sacrificados 48 h após a primeira injeção (250 células $CD117^{+}Ly\text{-}6\ A/E^{+}$ por µL). AMD-3100 e Spiegelmer de ligação de SDF-1 revNOX-A12-JE40 não mostraram qualquer efeito, (ver Figura 34 para uma representação gráfica de todos os pontos de tempo e todos os grupos).

[000494] Em consequência de tratamento de Spiegelmer de ligação de SDF-1 NOX-A12-JE40, o aumento transiente de HSC/HPCs foi acompanhado por um aumento transiente na contagem de célula de sangue branca total, que é principalmente acionada por números aumentados de macrófagos, granulócitos e neutrófilos, e por eosinófilos. Neupogen foi verificado induzir um aumento na contagem de célula de sangue branca (contagem WBC) acoplada com uma diminuição nos eosinófilos [%] (ver Figura 41).

10.6 Resultados dos ensaios de CFU

[000495] Comparadas ao veículo (0,8 CFU/mL), todas as substâncias conduziram a valores médios aumentados de CFUs totais. Contudo, revNOX-A12-JE40 (6 h) e AMD3100 (6 h) somente mostraram efeitos marginais (1,1 e 1,5 CFU/mL, respectivamente). Uma injeção de Spiegelmer de ligação de SDF-1 NOX-A12-JE40 conduziu a cerca de mais CFUs/mL de sangue após 6 h, visto que quatro injeções de G-CSF (medida 48 h após a primeira injeção e 12 h após a 4ª injeção) (3,7 e 3,2 CFU/mL, respectivamente). Isto é quatro vezes o valor encontrado para o veículo. Spiegelmer de ligação de SDF-1 NOX-A12-NO30 dobrou a contagem de CFU comparado ao veículo (1,9 CFU/mL). Ver Figura 35 para um resumo.

Exemplo 11 Inibição de neovascularização coroidal (CNV)

[000496] O modelo de animal de "neovascularização coroidal induzida por laser" é usado para prognosticar o efeito de fármacos investigacionais em neovasculatura retiniana humana e coroidal. Isto ocorre em doenças similares a degeneração macular úmida ou 'proliferativa' relacionada a idade(AMD), retinopatia diabética e oclusão de veia retiniana. CXCR4 foi mostrado ser expresso no CNV induzido por laser (Lima e Silva e outros., FASEB J. 21:, 2007). Ele foi colocalizado com células que expressam CD45 e F4/80 sugerindo que estas células são macrófagos derivados de BM. Inibidores para

CXCR4 reduzem CNV induzido por laser. Mas não foi investigado se estas células expressam SDF1 também. Neste estudo nós avaliamos se o Spiegelmer de ligação de SDF-1 NOX-A12-JE40 (SEQ.ID. 132) bloqueia neovascularização.

11.1 Métodos

[000497] Vinte e dois camundongos C57/BL6J não mais jovens do que 12 semanas foram anestesiados e tratados com 3 queimaduras a laser por olho. Os animais desenvolveram neovascularização coroidal nos locais do laser. Um dia depois, 2 µl de 440 µM de solução de Spiegelmer de ligação de SDF-1 NOX-A12-JE40 dissolvida em solução de Ringer foram injetados intravitrealmente em um olho (dose: 0,88 nmol = 12,9 µg [oligo parte da molécula somente] = 48 µg [molécula total incluindo PEG]), enquanto o outro olho recebeu solução de Ringer como um controle. 14 dias após tratamento com laser, os animais foram perfundidos com dextran-fluoresceína, e quantidades coroidais totais foram preparadas. As quantidades totais foram avaliadas para mudanças vasculares da coroide e da área da membrana de CNV.

[000498] A medida que um olho foi injetado com Spiegelmer e o outro olho de cada animal recebeu tampão somente, o teste assinalado de Wilcoxon que é concernente a diferença entre olho tratado e de controle de cada animal foi usado. O teste assinalado de Wilcoxon analisa as diferenças entre duas medições relacionadas, em nosso caso olhos tratados e de controle de cada animal. Reconhece-se diferenças significantes mesmo se o conjunto dos olhos tratados e o conjunto dos olhos tratados não são estatisticamente diferentes. O seguinte comando R foi usado: teste wilcoxsigh (Vl ~ V2, dados = dO, distribuição = "exata") $p < 0,05$ é significante no nível 95%.

11.2 Resultados

[000499] Treze dos 22 camundongos podem ser avaliados. A média

da área de neovascularização dos olhos tratados com NOX-A12-JE40 foi menor do que a média dos olhos tratados com solução de Ringer, indicando que a formação de CNV reduziu Spiegelmer. O valor p calculado pelo teste assinalado de pares equiparados de Wilcoxon foi 0,021. Portanto, é concluído que o Spiegelmer de ligação de SDF-1 NOX-A12-JE40 reduz significantemente a neovascularização coroidal induzida por laser no modelo de camundongo CNV, sugerindo benefício terapêutico potencial (ver Figura 36).

Exemplo 12 Eficácia em nefropatia diabética

[000500] Glomerulosclerose, por exemplo, em diabetes, permanece uma causa condutora de doença renal de estágio terminal porque tem como alvo os patomecanismos que nem sempre previnem a progressão da doença. Consequentemente, outras estratégias de tratamento são requeridas para adicionar no armamento terapêutico para glomerulosclerose. Dados de estudos experimentais recentes se relacionam a progressão de glomerulosclerose em camundongos diabéticos e humanos para inflamação intrarenal. Por exemplo, micofenolato mofetil, metotrexato, ou irradiação reduzem a excreção de alumina urinária, e glomerulosclerose em ratos com diabetes induzida por streptozotocin. Ainda, os mecanismos moleculares e celulares de inflamação intrarenal em nefropatia diabética permanecem pobremente caracterizados. Pacientes com nefropatia diabética têm níveis de soro aumentados de marcadores de fase aguda de inflamação, mas isto pode não representar inflamação intrarenal.

[000501] Neste estudo o bloqueio de começo de SDF-1 com Epigelmer de ligação de SDF-1 NOX-A12-JE40 (SEQ.ID. 132) foi testado em db/db camundongos que receberam uma uninefrectomia na idade de 6 semanas. A administração de NOX-A12-JE40 começou na idade de 4 meses e foi feita 3 vezes uma semana a uma dose de

50 mg/kg s.c (corresponde a 13,4 mg/kg de parte de oligonucleotídeo). Dois meses mais tarde, os animais foram sacrificados e a contagem de glomerulosclerose foi determinada. Por esta contagem, glomeruli individuais são contados por infiltração de leucócitos, e cicatrização do tecido. Uma contagem de 0 descreve um glomerulus saudável, enquanto uma contagem de 4 descreve a forma completamente fibrótica (Ninichuk, Clauss e outros. 2008).

12.2 Resultados

[000502] Enquanto camundongos tipo selvagem têm quase nenhum dano no rim na idade de seis meses, db/db camundongos da mesma idade revelam um dano marcado no rim. O dano no rim em db/db camundongos que foram uninefrectomizados na idade de seis semanas é ainda mais forte.

[000503] Spiegelmer de ligação de SDF-1 NOX-A12-JE40 (SEQ.ID. 132), mas não o Spiegelmer de controle não-específico revNOX-A12-JE40 (SEQ.ID. 243) da sequência reversa melhora significantemente o dano do rim que foi observado em camundongos uninefrectomizados db/db após seis meses: Existem significantemente números inferiores de glomeruli com a contagem de dano mais alta (3 e 4). Ao invés, mais alterações súbitas (infiltração de leucócito) foram observadas em um número mais alto de glomeruli (ver Figura 37).

Exemplo 13 Spiegelmer de ligação de SDF-1 NOX-A12-JE40 inibe derrame vascular retiniano induzido por VEGF em coelhos pigmentados.

[000504] Derrame vascular de vasos retinianos ocorrem em várias doenças do olho, similares a degeneração macular relacionada a idade e oclusão de veia retiniana. Ele conduz a edema macular que prejudica a visão.

13.1 Métodos

[000505] Em um modelo de animal, derrame vascular retiniano pode

ser induzido por uma injeção de VEGF intravítrea em coelhos. Neste modelo, a permeabilidade da vasculatura retiniana é medida por fotometria de fluoresceína 48 h após injeção intravítrea de VEGF. A injeção item teste foi feita 5 dias antes do estímulo de VEGF. A permeabilidade que é observada dois dias após a administração de VEGF é considerada não ser diretamente relacionada ao aumento de permeabilidade que é transientemente observado após um estímulo de VEGF, mas preferivelmente um efeito de processos à jusante de mais duradouros que são disparados pela injeção de VEGF (Edelman, Lutz e outros. 2005). Neste estudo, oito coelhos pigmentados (Fauve de Burgogne, 2-3 meses de idade) foram usados por grupo. Os grupos foram:

- 4 grupos de dose de NOX-A12-JE40 (105 nmol, 40 nmols, 8 nmols, 1,6 nmol)

- um grupo de substância de referência (Kenacort retard(R) (4 % triamcinolone acetonida), 2 mg i.vt.) e

- veículo (5 % de glicose para infusão). O volume de injeção foi 50 µL para todos os grupos. Cinco dias após administração da substância nos olhos direitos, VEGF foi também somente administrado nos olhos direitos: 500 ng de $VEGF_{165}$ humano recombinante em 50 µL de PBS. 48 h mais tarde, a permeabilidade retiniana foi medida em animais anestesiados por fluorometria ocular (1 h após uma injeção i.v. de sódio fluoresceína (10 % em 0,9 % de cloreto de sódio, 50 mg/kg)). Brevemente, a intensidade de fluorescência é escaneada in vivo ao longo do eixo ótico da córnea para a retina de ambos os olhos usando-se um dispositivo fluorotron (FM-2 Fluorotron Master). As curvas de distribuição de intensidade resultantes são integradas, e a proporção da área sob a curva (AUC) do olho tratado para o olho não-tratado foi calculada. Os valores médios do grupo e desvios padrões foram então calculados e representados em um gráfico.

13.2 Resultados

[000506] Injeção intravítrea de 105 e 40 nmols de Spiegelmer de ligação de SDF-1 NOX-A12-JE40 em 50 µL de glicose 5 dias antes de injeção de $VEGF_{165}$ humano recombinante (500 ng em 50 µ*L)* inibiu significantemente a permeabilização induzida por VEGF da vasculatura retiniana 48 h após o estímulo de VEGF. O item de referência triamcinolone também mostrou uma forte redução na permeabilidade vascular. Experimentos de BiaCore que tinham sido feitos anteriormente conformaram que nenhuma ligação de VEGF de Speigelmer de ligação de SDF-1 NOX-A12-JE40 ocorreu nas concentrações usadas. Portanto, pode ser assumido que NOX-A12-JE40 bloqueia uma trajetória a jusante de VEGF (por exemplo, recrutamento de leucócitos, afrouxamento de junções endoteliais apertadas como um efeito de sobre expressão de SDF-1) que conduz a permeabilidade vascular prolongada (ver Figura 38). NOX-A12-JE40 pode, portanto, ser útil para o tratamento de edema macular ou edema retiniano ou secundário a degeneração macular relacionada a idade ou oclusão de veia retiniana.

Exemplo 14 Spiegelmer de ligação de SDF-1 NOX-A12-JE40 inibe angiogênese em retinopatia induzida por oxigênio

[000507] O modelo de camundongo de retinopatia induzida por oxigênio é um modelo para a imitação de neovascularização induzida por hipóxia da retina, conforme observado em retinopatia diabética, especialmente retinopatia diabética proliferativa, e em degeneração macular relacionada a idade (Smith, Wesolowski e outros. 1994). O modelo é também referido como *retinopatia de prematuridade* visto que bebês prematuros que foram postos em incubadoras nos hospitais ficaram cegos devido a exposição muito alta de oxigênio nas incubadoras que conduziram a um crescimento de vaso retiniano anormal durante o tempo na incubadora e após seu retorno a

condições normóxicas.

14.1 Métodos

[000508] No modelo de camundongo, camundongos recém-nascidos C57BL/6J foram incubados a 75% de oxigênio a partir dos dias pós-natal P5-P12. Após retorno ao oxigênio normal, os animais desenvolveram neovascularização retiniana devido a hipóxia relativa. Spiegelmer de ligação de SDF-1 NOX-A12-JE40 (880 pmols em 2 µL de solução de Ringer) foi injetado no dia PI2. No dia PI7, os camundongos foram perfundidos com dextran-fluoresceína para visualizar a vasculatura retiniana. Montagens retinianas totais foram usadas para avaliar as mudanças vasculares da vasculatura retiniana de um modo codificado por um item de contagem. Perfusão de FITC-Dextran permite a avaliação de vasos perfundidos somente. De modo a visualizar vasos não ainda perfundidos imaturos, as montagens totais foram marcadas com isolectina-B4 e analisadas sob um microscópio de fluorescência consequentemente. Os olhos tratados com Spiegelmer de ligação de SDF-1 foram comparados com os olhos tratados com veículo em uma maneira intraindividual. A significância foi calculada pelo teste assinalado Wilcoxon, p = 0,05 corresponde a 95% de confidência.

[000509] Os seguintes parâmetros foram contados:

1. número de grupos de vaso
2. tamanho de área absoluta de grupo
3. tamanho de área relativa de grupo
4. número de germinação de vasos (tufos)
5. tamanho absoluto da zona avascular
6. tamanho relativo da zona avascular

[000510] A contagem de retinopatia foi calculada destes parâmetros nas imagens FITC-dextran (Higgins, Yu e outros. 1999). Os níveis de significância para os parâmetros e a contagem de retinopatia são

mostrados na Figura 40.

14.2 Resultados

[000511] Fora de 34 camundongos testados, 24 montagens totais podem ser avaliadas após perfusão de FITC-dextran, e 15 podem ser avaliadas após marcação de isolectina. Uma injeção simples de 880 pmols de Spiegelmer de ligação de SDF-1 NOX-A12-JE40 no dia P12 inibiu significantemente formação de tufo e, desse modo, aperfeiçoou a contagem de retinopatia total conforme observado no dia P17 (ver Figuras 39 e 40). Portanto, NOX-A12-JE40 pode ter um efeito benéfico em doenças com neovascularização induzida por hipóxia, especialmente do olho (por exemplo, retinopatia diabética, AMD).

Bibliografia

[000512] Os dados bibliográficos completos dos documentos aqui colocados são, se não indicado ao contrário, conforme seguem, pelo que a revelação de referidas referências é incorporada aqui por referência.

[000513] Abi-Younes, S., A. Sauty, e outros. (2000). "The stromal cell-derived factor-1 chemokine is a potent platelet agonist highly expressed in atherosclerotic plaques." Circ Res 86(2): 131-8.

[000514] Aiuti, A., I. J. Webb, e outros. (1997). "The chemokine SDF-1 is a chemoattractant for human CD34+ hematopoietic progenitor cells and provides a new mechanism to explain the mobilization of CD34+ progenitors to peripheral blood." J Exp Med 185(1): 111-20.

[000515] Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990), Basic local alignment search tool. J Mol Biol. 215(3):403-10.

[000516] Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res. 25(17):3389-402.

[000517] Ambati, J., A. Anand, e outros. (2003). An animal model of

age-related macular degeneration in senescent Ccl-2- or Ccr-2-deficient mice. Nat Med. 9: 1390-7.

[000518] Arya, S. K., C. C. Ginsberg, e outros. (1999). "In vitro phenotype of SDF1 gene mutant that delays the onset of human immunodeficiency virus disease in vivo." J Hum Virol 2(3): 133-8.

[000519] Auerbach e outros. (2003) Angiogenesis assays: a critical overview. Clin:Chem. 49: 32-40.

[000520] Avniel, S., Z. Arik, e outros. (2006). "Involvement of the CXCL12/CXCR4 pathway in the recovery of skin following burns." J Invest Dermatol 126(2): 468-76.

[000521] Baggiolini, M. (1998). "Chemokines and leukocyte traffic." Nature 392(6676): 565-8.

[000522] Baggiolini, M., B. Dewald, e outros. (1994). "Interleukin-8 and related chemotactic cytokines~CXC and CC chemokines." Adv Immunol 55: 97-179.

[000523] Balabanian K, Lagane B, Infantino S, Chow KY, Harriague J, Moepps B, Arenzana-Seisdedos F, Thelen M, Bachelerie F (2005) The chemokine SDF-1/CXCL12 binds to and signals through the orphan receptor RDC1 in T lymphocytes. J Biol Chem 280(42): 35760-35766

[000524] Balabanian, K., B. Lagane, e outros. (2005). "WHIM syndromes with different genetic anomalies are accounted for by impaired CXCR4 desensitization to CXCL12." Blood 105(6): 2449-57.

[000525] Balabanian, K., J. Couderc, e outros. (2003). "Role of the chemokine stromal cell-derived factor 1 in autoantibody production and nephritis in murine lupus." J Immunol 170(6): 3392-400.

[000526] Balkwill, F. (2004). "Cancer and the chemokine network." Nat Rev Cancer 4(7): 540-50.

[000527] Bazan, J. F., K. B. Bacon, e outros. (1997). "A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif." Nature 385(6617):

640-4.

[000528] Bertolini, F., C. Dell'Agnola, e outros. (2002). "CXCR4 neutralization, a novel therapeutic approach for non-Hodgkin's lymphoma." Cancer Res 62(11): 3106-12.

[000529] Bleul, C. C, J. L. Schultze, e outros. (1998). "B lymphocyte chemotaxis regulated in association with microanatomic localization, differentiation state, and B cell receptor engagement." J ExpMed 187(5): 753-62.

[000530] Bleul, C. C, M. Farzan, e outros. (1996). "The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry." Nature 382(6594): 829-33.

[000531] Bleul, C. C, R. C. Fuhlbrigge, e outros. (1996). "A highly efficacious lymphocyte chemoattractant, stromal cell-derived factor 1 (SDF-1)." J Exp Med 184(3): 1101-9.

[000532] Brooks, H. L., Jr., S. Caballero, Jr., e outros. (2004). "Vitreous levels of vascular endothelial growth factor and stromal-derived factor 1 in patients with diabetic retinopathy and cystoid macular edema before and after intraocular injection of triamcinolone." Arch Ophthalmol 122(12): 1801-7.

[000533] Broxmeyer, H. E., A. Orazi, e outros. (1998). "Myeloid progenitor cell proliferation and mobilization effects of BB10010, a genetically engineered variant of human macrophage inflammatory protein-1 alpha, in a phase I clinical trial in patients with relapsed/refractory breast cancer." Blood Cells Mol Dis 24(1): 14-30.

[000534] Broxmeyer, H. E., L. Benninger, e outros. (1995). "Effects of in vivo treatment with PIXY321 (GM-CSF/IL-3 fusion protein) on proliferation kinetics of bone marrow and blood myeloid progenitor cells in patients with sarcoma." Exp Hematol 23(4): 335-40.

[000535] Buckley, C. D., N. Amft, e outros. (2000). "Persistent induction of the chemokine receptor CXCR4 by TGF-beta 1 on synovial

T cells contributes to their accumulation within the rheumatoid sinovio." J Immunol 165(6): 3423-9.

[000536] Burger, J. A., N. Tsukada, e outros. (2000). "Blood-derived nurse-like cells protect chronic lymphocytic leukemia B cells from spontaneous apoptosis through stromal cell-derived factor-1." Blood 96(8): 2655-63.

[000537] Burns JM, Summers BC, Wang Y, Melikian A, Berahovich R, Miao Z, Penfold ME, Sunshine MJ, Liftman DR, Kuo CJ, Wei K, McMaster BE, Wright K, Howard MC, Schall TJ (2006) A novel chemokine receptor for SDF-1 and I-TAC involved in cell survival, cell adhesion, and tumor development. J Exp Med 203(9): 2201-2213

[000538] Burt, R. K., A. Marmont, e outros. (2006). "Randomized controlled trials of autologous hematopoietic stem cell transplantation for autoimmune diseases: the evolution from myeloablative to lymphoablative transplant regimens." Arthritis Rheum 54(12): 3750-60.

[000539] Butler JM, Guthrie SM, Koc M, Afzal A, Caballero S, Brooks HL, Mames RN, Segal MS, Grant MB, Scott EW (2005) SDF-1 is both necessary and sufficient to promote proliferative retinopathy. J Clin Invest 115(1): 86-93

[000540] Butler, J. M., S. M. Guthrie, e outros. (2005). "SDF-1 is both necessary and sufficient to promote proliferative retinopathy." J Clin Invest 115(1): 86-93.

[000541] Cabioglu, N., A. Sahin, e outros. (2005). "Chemokine receptor CXCR4 expression in breast cancer as a potential predictive marker of isolated tumor cells in bone marrow." Clin Exp Metastasis 22(1): 39-46.

[000542] Chow FY, Nikolic-Paterson DJ, Ma FY, Ozols E, Rollins BJ, Tesch GH (2007) Monocyte chemoattractant protein-1-induced tissue inflammation is critical for the development of renal injury but not tipo 2 diabetes in obese db/db mice. Diabetologia 50(2): 471-480

[000543] Chow FY, Nikolic-Paterson DJ, Ozols E, Atkins RC, Rollin BJ, Tesch GH (2006) Monocyte chemoattractant protein-1 promotes the development of diabetic renal injury in streptozotocin-treated mice. Kidney Int 69(1): 73-80

[000544] Corcione, A., L. Ottonello, e outros. (2000). "Stromal cell-derived factor-1 as a chemoattractant for follicular center lymphoma B cells." J Natl Cancer Inst 92(8): 628-35.

[000545] Croop, J. M., R. Cooper, e outros. (2000). "Large-scale mobilization and isolation of CD34+ cells from normal donors." Bone Marrow Transplant 26(12): 1271-9.

[000546] Crump, M. P., J. H. Gong, e outros. (1997). "Solution structure and basis for functional activity of stromal cell-derived factor-1; dissociation of CXCR4 activation from binding and inhibition of HIV-1." Embo J 16(23): 6996-7007.

[000547] Dale, D. C, W. C. Liles, e outros. (1998). "Effects of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) on neutrophil kinetics and function in normal human volunteers." Am J Hematol 57(1): 7-15.

[000548] Damha, M.J., Ogilvie, K.K.(1993) Methods in Molecular Biology, Vol. 20 Protocols for oligonucleotides and analogs, ed. S. Agrawal, p. 81-114, Humana Press Inc. 1993

[000549] DApuzzo, M., A. Rolink, e outros. (1997). "The chemokine SDF-1, stromal cell-derived factor 1, attracts early stage B cell precursors via the chemokine receptor CXCR4." Eur J Immunol 27(7): 1788-93.

[000550] Dawn B, Tiwari S, Kucia MJ, Zuba-Surma EK, Guo Y, Sanganalmath SK, Abdel-Latif A, Hunt G, Vincent RJ, Taher H, Reed NJ, Ratajczak MZ, Bolli R (2008) Transplantation of bone marrow-derived very small embryonic-like stem cells attenuates left ventricular dysfunction and remodeling after myocardial infarction. Stem Cells

26(6): 1646-1655

[000551] De Klerck, B., L. Geboes, e outros. (2005). "Pro-inflammatory properties of stromal cell-derived factor-1 (CXCL12) in collagen-induced arthritis." Arthritis Res Ther 7(6): R1208-20.

[000552] Eaton, B. E., L. Gold, e outros. (1997). "Post-SELEX combinatorial optimization of aptamers." Bioorg Med Chem 5(6): 1087-96.

[000553] Edelman JL, Lutz D, Castro MR (2005) Corticosteroids inhibit VEGF-induced vascular leakage in a rabbit model of blood-retinal and blood-aqueous barrier breakdown. Exp Eye Res 80(2): 249-258

[000554] Edelman, J. L., D. Lutz, e outros. (2005). "Corticosteroids inhibit VEGF-induced vascular leakage in a rabbit model of blood-retinal and blood-aqueous barrier breakdown." Exp Eye Res 80(2): 249-58.

[000555] Fedyk, E. R., D. H. Ryyan, e outros. (1999). "Maturation decreases responsiveness of human bone marrow B lineage cells to stromal-derived factor 1 (SDF-1)." J Leukoc Biol 66(4): 667-73.

[000556] Fedyk, E. R., D. Jones, e outros. (2001). "Expression of stromal-derived factor-1 is decreased by IL-1 and TNF and in dermal wound healing." J Immunol 166(9): 5749-54.

[000557] Fierro, F. A., S. Brenner, e outros. (2008). "Combining SDF-1/CXCR4 antagonism and chemotherapy in relapsed acute myeloid leukemia." Leukemia.

[000558] Fong, D. S., L. P. Aiello, e outros. (2004). "Diabetic retinopathy." Diabetes Care 27(10): 2540-53.

[000559] Fransioli J, Bailey B, Gude NA, Cottage CT, Muraski JA, Emmanuel G, Wu W, Alvarez R, Rubio M, Ottolenghi S, Schaefer E, Sussman MA (2008) Evolution of the c-kit-positive cell response to pathological challenge in the myocardium. Stem Cells 26(5): 1315-

1324

[000560] Friedlander M, Dorrell MI, Ritter MR, Marchetti V, Moreno SK, El-Kalay M, Bird AC, Banin E, Aguilar E (2007) Progenitor cells and retinal angiogenesis. Angiogenesis 10(2): 89-101

[000561] Garrido, S. M., F. R. Appelbaum, e outros. (2001). "Acute myeloid leukemia cells are protected from spontaneous and drug-induced apoptosis by direct contact with a human bone marrow stromal cell line (HS-5)." Exp Hematol 29(4): 448-57.

[000562] Gear, A. R., S. Suttitanamongkol, e outros. (2001). "Adenosine diphosphate strongly potentiates the ability of the chemokines MDC, TARC, and SDF-I to stimulate platelet function." Blood 97(4): 937-45.

[000563] Geminder, H., O. Sagi-Assif, e outros. (2001). "A possible role for CXCR4 and its ligand, the CXC chemokine stromal cell-derived factor-1, in the development of bone marrow metastases in neuroblastoma." J Immunol 167(8): 4747-57.

[000564] Glaspy, J. A., E. J. Shpall, e outros. (1997). "Peripheral blood progenitor cell mobilization using stem cell factor in combination with filgrastim in breast cancer patients." Blood 90(8): 2939-51.

[000565] Glaspy, J., M. W. Davis, e outros. (1996). "Biology and clinical potential of stem-cell factor." Cancer Chemother Pharmacol 38 Suppl: S53-7.

[000566] Godessart, N. (2005). "Chemokine receptors: attractive targets for drug discovery." Ann N Y AcadSci 1051: 647-57.

[000567] Godot, V., M. Arock, e outros. (2007). "H4 histamine receptor mediates optimal migration of mast cell precursors to CXCL12." J Allergy Clin Immunol 120(4): 827-34.

[000568] Gombert, M., M. C. Dieu-Nosjean, e outros. (2005). "CCL1-CCR8 interactions: an axis mediating the recruitment of T cells and Langerhans-tipo dendritic cells to sites of atopic skin inflammation." J

Immunol 174(8): 5082-91.

[000569] Gonzalo, J. A., C. M. Lloyd, e outros. (2000). "Critical involvement of the chemotactic axis CXCR4/stromal cell-derived factor-1 alpha in the inflammatory component of allergic airway disease." J Immunol 165(1): 499-508.

[000570] Grassi, F., S. Cristino, e outros. (2004). "CXCL12 chemokine up-regulates bone resorption and MMP-9 release by human osteoclasts: CXCL12 levels are increased in synovial and bone tissue of rheumatoid arthritis patients." J Cell Physiol 199(2): 244-51.

[000571] Gratwohl A, Baldomero H, Horisberger B, Schmid C, Passweg J, Urbano-Ispizua A (2002) Current trends in hematopoietic stem cell transplantation in Europe. Blood 100(7): 2374-2386

[000572] Grunewald, M., I. Avraham, e outros. (2006). "VEGF-induced adult neovascularization: recruitment, retention, and role of accessory cells." Cell 124(1): 175-89.

[000573] Gu, J., E. Marker-Hermann, e outros. (2002). "A 588-gene microarray analysis of the peripheral blood mononuclear cells of spondyloarthropathy patients." Rheumatology (Oxford) 41(7): 759-66.

[000574] Guleng, B., K. Tateishi, e outros. (2005). "Blockade of the stromal cell-derived factor-1/CXCR4 axis attenuates in vivo tumor growth by inhibiting angiogenesis in a vascular endothelial growth factor-independent manner." Cancer Res 65(13): 5864-71.

[000575] Gulino, A. V., D. Moratto, e outros. (2004). "Altered leukocyte response to CXCL12 in patients with warts hypogammaglobulinemia, infections, myelokathexis (WHIM) syndrome." Blood 104(2): 444-52.

[000576] Hartmann, T. N., M. Burger, e outros. (2004). "The role of adhesion molecules and chemokine receptor CXCR4 (CD 184) in small cell lung cancer." J Biol Regul Homeost Agents 18(2): 126-30.

[000577] Higgins, R. D., K. Yu, e outros. (1999). "Diltiazem reduces

retinal neovascularization in a mouse model of oxygen induced retinopathy." Curr Eye Res 18(1): 20-7.

[000578] Hodohara, K., N. Fujii, e outros. (2000). "Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) acts together with thrombopoietin to enhance the development of megakaryocytic progenitor cells (CFU-MK)." Blood 95(3): 769-75.

[000579] Hoshino, M., N. Aoike, e outros. (2003). "Increased immunoreactivity of stromal cell-derived factor-1 and angiogenesis in asthma." Eur Respir J 21(5): 804-9.

[000580] Hwang, J. H., H. K. Chung, e outros. (2003). "CXC chemokine receptor 4 expression and function in human anaplastic thyroid cancer cells." J Clin Endocrinol Metab 88(1): 408-16.

[000581] Ito T, Suzuki A, Imai E, Okabe M, Hori M (2001) Bone marrow is a reservoir of repopulating mesangial cells during glomerular remodeling. J Am Soc Nephrol 12(12): 2625-2635

[000582] Iwamoto T, Okamoto H, Toyama Y, Momohara S (2008) Molecular aspects of rheumatoid arthritis: chemokines in the joints of patients. FEBS J

[000583] Jackson, K. A., S. M. Majka, e outros. (2001). "Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells." J Clin Invest 107(11): 1395-402.

[000584] Jiang, W., P. Zhou, e outros. (1994). "Molecular cloning of TPAR1, a gene whose expression is repressed by the tumor promoter 12-0-tetradecanoylphorbol 13-acetate (TPA)." Exp Cell Res 215(2): 284-93.

[000585] Jin, L., K. J. Hope, e outros. (2006). "Targeting of CD44 eradicates human acute myeloid leukemic stem cells." Nat Med 12(10): 1167-74.

[000586] Jin, L., Y. Tabe, e outros. (2008). "CXCR4 up-regulation by imatinib induces chronic myelogenous leukemia (CML) cell migration to

bone marrow stroma and promotes survival of quiescent CML cells." Mol Cancer Ther 7(1): 48-58.

[000587] Jo, D. Y., S. Rafii, e outros. (2000). "Chemotaxis of primitive hematopoietic cells in response to stromal cell-derived factor-1." J Clin Invest 105(1): 101-11.

[000588] Jose, P. J., D. A. Griffiths-Johnson, e outros. (1994). "Eotaxin: a potent eosinophil chemoattractant cytokine detected in a guinea pig model of allergic airways inflammation." J Exp Med 179(3): 881-7.

[000589] Juarez, J. and L. Bendall (2004). "SDF-1 and CXCR4 in normal and malignant hematopoiesis." Histol Histopathol 19(1): 299-309.

[000590] Kanbe, K., K. Takagishi, e outros. (2002). "Stimulation of matrix metalloprotease 3 release from human chondrocytes by the interaction of stromal cell-derived factor 1 and CXC chemokine receptor 4." Arthritis Rheum 46(1): 130-7.

[000591] Kang, H., G. Watkins, e outros. (2005). "Stromal cell derived factor-1: its influence on invasiveness and migration of breast cancer cells in vitro, and its association with prognosis and survival in human breast cancer." Breast Cancer Res 7(4): R402-10.

[000592] Kawai, T., U. Choi, e outros. (2005). "Enhanced function with decreased internalization of carboxy-terminus truncated CXCR4 responsible for WHIM syndrome." Exp Hematol 33(4): 460-8.

[000593] Kim KW, Cho ML, Kim HR, Ju JH, Park MK, Oh HJ, Kim JS, Park SH, Lee SH, Kim HY (2007) Up-regulation of stromal cell-derived factor 1 (CXCL12) production in rheumatoid synovial fibroblasts through interactions with T lymphocytes: role of interleukin-17 and CD40L-CD40 interaction. Arthritis Rheum 56(4): 1076-1086

[000594] King, A. G., D. Horowitz, e outros. (2001). "Rapid mobilization of murine hematopoietic stem cells with enhanced

engraftment properties and evaluation of hematopoietic progenitor cell mobilization in rhesus monkeys by a single injection of SB-251353, a specific truncated form of the human CXC chemokine GRObeta." Blood 97(6): 1534-42.

[000595] Kocher, A. A., M. D. Schuster, e outros. (2001). "Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function." Nat Med 7(4): 430-6.

[000596] Koshiba, T., R. Hosotani, e outros. (2000). "Expression of stromal cell-derived factor 1 and CXCR4 ligand receptor system in pancreatic cancer: a possible role for tumor progression." Clin Cancer Res 6(9): 3530-5.

[000597] Krumbholz, M., D. Theil, e outros. (2006). "Chemokines in multiple sclerosis: CXCL12 and CXCL13 up-regulation is differentially linked to CNS immune cell recruitment." Brain 129:200-211.

[000598] Kryczek, I., A. Lange, e outros. (2005). "CXCL12 and vascular endothelial growth factor synergistically induce neoangiogenesis in human ovarian cancers." Cancer Res 65(2): 465-72.

[000599] Kucia, M., R. Reca, e outros. (2005). "Trafficking of normal stem cells and metastasis of cancer stem cells involve similar mechanisms: pivotal role of the SDF-1-CXCR4 axis." Stem Cells 23(7): 879-94.

[000600] Kulkarni O, Pawar RD, Purschke W, Eulberg D, Selve N, Buchner K, Ninichuk V, Segerer S, Vielhauer V, Klussmann S, Anders HJ (2007) Spiegelmer inhibition of CCL2/MCP-1 ameliorates lupus nephritis in MRL-(Fas)lpr mice. J Am Soc Nephrol 18(8): 2350-2358

Kusser, W. (2000). "Chemically modified nucleic acid aptamers for in vitro selections: evolving evolution." J Biotechnol 74(1): 27-38.

[000601] Lagane, B., K. Y. Chow, e outros. (2008). "CXCR4

dimerization and {beta}-arrestin-mediated signaling account for the enhanced chemotaxis to CXCL12 in WHIM syndrome." Blood.

[000602] Lapteva, N., A. G. Yang, e outros. (2005). "CXCR4 knockdown by small interfering RNA abrogates breast tumor growth in vivo." Cancer Gene Ther 12(1): 84-9.

[000603] Li JK, Yu L, Shen Y, Zhou LS, Wang YC, Zhang JH (2008) Inhibition of CXCR4 activity with AMD3100 decreases invasion of human colorrectal cancer cells in vitro. World J Gastroenterol 14(15): 2308-2313

[000604] Li Y, Atmaca-Sonmez P, Schanie CL, Ildstad ST, Kaplan HJ, Enzmann V (2007) Endogenous bone marrow derived cells express retinal pigment epithelium cell markers and migrate to focal areas of RPE damage. Invest Onhthalmol Vis Sci 48(9): 4321-4327

[000605] Li Y, Reca RG, Atmaca-Sonmez P, Ratajczak MZ, Ildstad ST, Kaplan HJ, Enzmann V (2006) Retinal pigment epithelium damage enhances expression of chemoattractants and migration of bone marrow-derived stem cells. Invest Ophthalmol Vis Sci 47(4): 1646-1652

[000606] Liang Z, Brooks J, Willard M, Liang K, Yoon Y, Kang S, Shim H (2007) CXCR4/CXCL12 axis promotes VEGF-mediated tumor angiogenesis through Akt signaling pathway. Biochem Biophys Res Commun 359(3): 716-722

[000607] Lima e Silva R, Shen J, Hackett SF, Kachi S, Akiyama H, Kiuchi K, Yokoi K, Hatara MC, Lauer T, Aslam S, Gong YY, Xiao WH, Khu NH, Thut C, Campochiaro PA (2007) The SDF-1/CXCR4 ligand/receptor pair is an important contributor to several types of ocular neovascularization. FASEB J 21(12): 3219-3230

[000608] Ma, Q., D. Jones, e outros. (1998). "Impaired B-lymphopoiesis, myelopoiesis, and derailed cerebellar neuron migration in CXCR4- and SDF-1-deficient mice." Proc Natl Acad Sci USA95(16): 9448-53.

[000609] Maekawa, T. and T. Ishii (2000). "Chemokine/receptor dynamics in the regulation of hematopoiesis." Intern Med 39(2): 90-100.

[000610] Majka M, Kucia M, Ratajczak MZ (2005) Stem cell biology - a never ending quest for understanding. Acta Biochim Pol 52(2): 353-358

[000611] Majka, M., A. Janowska-Wieczorek, e outros. (2000). "Stromal-derived factor 1 and thrombopoietin regulate distinct aspects of human megakaryopoiesis." Blood 96(13): 4142-51.

[000612] Mames RN, Mattheus A, Butler J, Brown G, Jorgensen M, Scott E (2006). New anti SDF-1 antinody prevents retinal neovascularization in primates. ARVO; May 1, 2006; Fort Lauderdale.

[000613] Marechal, V., F. Arenzana-Seisdedos, e outros. (1999). "Opposite effects of SDF-1 on human immunodeficiency virus tipo 1 replication." J Virol 73(5): 3608-15.

[000614] Matsunaga, T., N. Takemoto, e outros. (2003). "Interaction between leukemic-cell VLA-4 and stromal fibronectin is a decisive factor for minimal residual disease of acute myelogenous leukemia." Nat Med 9(9): 1158-65.

[000615] Matthys, P., S. Hatse, e outros. (2001). "AMD3100, a potent and specific antagonist of the stromal cell-derived factor-1 chemokine receptor CXCR4, inhibits autoimmune joint inflammation in IFN-gamma receptor-deficient mice." J Immunol 167(8): 4686-92.

[000616] McGinnis S, Madden TL (2004). BLAST: at the core of a powerful and diverse set of sequence analysis tools. Nucleic Acids Res. 32(Web Server issue):W20-5.

[000617] Meleth, A. D., E. Agron, e outros. (2005). "Serum inflammatory markers in diabetic retinopathy." Invest Ophthalmol Vis Sci 46(11): 4295-301.

[000618] Menu, E., K. Asosingh, e outros. (2006). "The involvement

of stromal derived factor 1 alpha in homing and progression of multiple myeloma in the 5TMM model." Haematologica.

[000619] Miller, M. D. and M. S. Krangel (1992). "Biology and biochemistry of the chemokines: a family of chemotactic and inflammatory cytokines." Grit Rev Immunol 12(1=2): 17-46.

[000620] Minges Wols HA, Ippolito JA, Yu Z, Palmer JL, White FA, Le PT, Witte PL (2007) The effects of microenvironment and internal programming on plasma cell survival. Int Immunol 19(7): 837-846

[000621] Minges Wols HA, Witte PL (2008) Plasma cell purification from murine bone marrow using a two-step isolation approach. J Immunol Methods 329(1-2): 219-224

[000622] Moser, B., M. Wolf, e outros. (2004). "Chemokines: multiple levels of leukocyte migration control." Trends Immunol 25(2): 75-84.

[000623] Mudry, R. E., J. E. Fortney, e outros. (2000). "Stromal cells regulate survival of B-lineage leukemic cells during chemotherapy." Blood 96(5): 1926-32.

[000624] Muller, A., B. Homey, e outros. (2001). "Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis." Nature 410(6824): 50-6.

[000625] Murdoch, C. (2000). "CXCR4: chemokine receptor extraordinaire." Immunol Rev 177: 175-84.

[000626] Murphy, P. M., M. Baggiolini, e outros. (2000). "International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors." Pharmacol Rev 52(1): 145-76.

[000627] Nagasawa, T. (2000). "A chemokine, SDF-1/PBSF, and its receptor, CXC chemokine receptor 4, as mediators of hematopoiesis." Int J Hematol 72(4): 408-11.

[000628] Nagasawa, T., H. Kikutani, e outros. (1994). "Molecular cloning and structure of a pre-B-cell growth-stimulating factor." Proc Natl Acad Sci U S A 91(6): 2305-9.

[000629] Nagasawa, T., S. Hirota, e outros. (1996). "Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1." Nature 382(6592): 635-8.

[000630] NCI NCI. (2001) Bone Marrow Transplantation and Peripheral Blood Stem Cell Transplantation: Questions and Answers. Fact Sheet, Vol. 2008.

[000631] Needleman & Wunsch (1970), A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins. J Mol Biol. 48(3):443-53.

[000632] Ninichuk, V., S. Clauss, e outros. (2008). "Late onset of Ccl2 blockade with the Spiegelmer mNOX-E3 6-3'PEG prevents glomerulosclerosis and improves glomerular filtration rate in db/db mice." Am J Pathol 172(3): 628-37.

[000633] Oppenheim, J. J., C. O. Zachariae, e outros. (1991). "Properties of the novel proinflammatory supergene "intercrine" cytokine family." Annu Rev Immunol 9: 617-48.

[000634] Orimo, A., P. B. Gupta, e outros. (2005). "Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion." Cell 121(3): 335-48.

[000635] Otani A, Kinder K, Ewalt K, Otero FJ, Schimmel P, Friedlander M (2002) Bone marrow-derived stem cells target retinal astrocytes and can promote or inhibit retinal angiogenesis. Nat Med 8(9): 1004-1010

[000636] Parretta, E., G. Cassese, e outros. (2005), "CD8 cell division maintaining cytotoxic memory occurs predominantly in the bone marrow." J Immunol 174(12): 7654-64.

[000637] Pearson & Lipman (1988), Improved tools for biological sequence comparison. Proc. Nat'l. Acad. Sci. EUA 85: 2444

[000638] Peled, A., I. Petit, e outros. (1999). "Dependence of human

stem cell engraftment and repopulation of NOD/SCID mice on CXCR4." Science 283(5403): 845-8.

[000639] Perissinotto, E., G. Cavalloni, e outros. (2005). "Involvement of chemokine receptor 4/stromal cell-derived factor 1 system during osteosarcoma tumor progression." Clin Cancer Res 11(2 Pt 1): 490-7.

[000640] Phillips, R. J., M. D. Burdick, e outros. (2003). "The stromal derived factor-1/CXCL12-CXC chemokine receptor 4 biological axis in non-small cell lung cancer metastases." Am J Respir Crit Care Med 167(12): 1676-86.

[000641] Ponath, P. D., S. Qin, e outros. (1996). "Cloning of the human eosinophil chemoattractant, eotaxin. Expression, receptor binding, and functional properties suggest a mechanism for the selective recruitment of eosinophils." J Clin Invest 97(3): 604-12.

[000642] Ponomaryov, T., A. Peled, e outros. (2000). "Induction of the chemokine stromal-derived factor-1 following DNA damage improves human stem cell function." J Clin Invest 106(11): 1331-9.

[000643] Pruijt, J. F., R. Willemze, e outros. (1999). "Mechanisms underlying hematopoietic stem cell mobilization induced by the CXC chemokine interleukin-8." Curr Opin Hematol 6(3): 152-8.

[000644] Radbruch, A., G. Muehlinghaus, e outros. (2006). "Competence and competition: the challenge of becoming a long-lived plasma cell." Nat Rev Immunol 6(10): 741-50.

[000645] Reddy, K., Z. Zhou, e outros. (2008). "Stromal cell-derived factor-1 stimulates vasculogenesis and enhances Ewing's sarcoma tumor growth in the absence of vascular endothelial growth factor." Int J Cancer.

[000646] Riviere, C, F. Subra, e outros. (1999). "Phenotypic and functional evidence for the expression of CXCR4 receptor during megakaryocytopoiesis." Blood 93(5): 1511-23.

[000647] Rosenfeld, C. S., B. Bolwell, e outros. (1996). "Comparison

of four cytokine regimens for mobilization of peripheral blood stem cells: IL-3 alone and combined with GM-CSF or G-CSF." Bone Marrow Transplant 17(2): 179-83.

[000648] Rubin, J. B., A. L. Kung, e outros. (2003). "A small-molecule antagonist of CXCR4 inhibits intracranial growth of primary brain tumors." Proc Natl Acad Sci U S A 100(23): 13513-8.

[000649] Salcedo R, Wasserman K, Young HA, Grimm MC, Howard OM, Anver MR, Kleinman HK, Murphy WJ, Oppenheim JJ (1999) Vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor induce expression of CXCR4 on human endothelial cells: In vivo neovascularization induced by stromal-derived factor-1 alpha. Am J Pathol 154(4): 1125-1135

[000650] Salcedo, R. and J. J. Oppenheim (2003). "Role of chemokines in angiogenesis: CXCL12/SDF-1 and CXCR4 interaction, a key regulator of endothelial cell responses." Microcirculation 10(3-4): 359-70.

[000651] Salcedo, R., K. Wasserman, e outros. (1999). "Vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor induce expression of CXCR4 on human endothelial cells: In vivo neovascularization induced by stromal-derived factor-1 alpha." Am J Pathol 154(4): 1125-35.

[000652] Salvucci, O., L. Yao, e outros. (2002). "Regulation of endothelial cell branching morphogenesis by endogenous chemokine stromal-derived factor-1." Blood 99(8): 2703-11.

[000653] Saur, D., B. Seidler, e outros. (2005). "CXCR4 expression increases liver and lung metastasis in a mouse model of pancreatic cancer." Gastroenterology 129(4): 1237-50.

[000654] Schall, T. J. and K. B. Bacon (1994). "Chemokines, leukocyte trafficking, and inflammation." Curr Opin Immunol 6(6): 865-73.

[000655] Schober, A. and A. Zernecke (2007). "Chemokines in vascular remodeling." Thromb Haemost 97(5): 730-7.

[000656] Schwarting S, Litwak S, Hao W, Bahr M, Weise J, Neumann H (2008) Hematopoietic Stem Cells Reduce Postischemic Inflammation and Ameliorate Ischemic Brain Injury. Stroke

[000657] Scotton CJ, Wilson JL, Scott K, Stamp G, Wilbanks GD, Fricker S, Bridger G, Balkwill FR (2002) Multiple actions of the chemokine CXCL12 on epithelial tumor cells in human ovarian cancer. Cancer Res 62(20): 5930-5938

[000658] Scotton, C. J., J. L. Wilson, e outros. (2002). "Multiple actions of the chemokine CXCL12 on epithelial tumor cells in human ovarian cancer." Cancer Res 62(20): 5930-8.

[000659] Sengupta, N., S. Caballero, e outros. (2005). "Preventing stem cell incorporation into choroidal neovascularization by targeting homing and attachment factors." Invest Ophthalmol Vis Sci 46(1): 343-8.

[000660] Shirozu, M., T. Nakano, e outros. (1995). "Structure and chromosomal localization of the human stromal cell-derived factor 1 (SDF1) gene." Genomics 28(3): 495-500.

[000661] Smith & Waterman (1981), Adv. Appl. Math. 2: 482

[000662] Smith, L. E., E. Wesolowski, e outros. (1994). "Oxygen-induced retinopathy in the mouse." Invest Ophthalmol Vis Sci 35(1): 101-11.

[000663] Soriano, A., C. Martinez, e outros. (2002). "Plasma stromal cell-derived factor (SDF)-I levels, SDF1-3'A genotype, and expression of CXCR4 on T lymphocytes: their impact on resistance to human immunodeficiency virus tipo 1 infection and its progression." J Infect Dis 186(7): 922-31.

[000664] Springer, T. A. (1995). "Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration." Annu Rev Physiol

57: 827-72.

[000665] Stem Cells: Scientific Progress and Future Research Directions. Department of Health and Human Services. June 2001. <http://stemcells.nih.gov/info/scireport/2001report>.

[000666] Sun, Y. X., A. Schneider, e outros. (2005). "Skeletal localization and neutralization of the SDF-1(CXCL12)/CXCR4 axis blocks prostate cancer metastasis and growth in osseous sites in vivo." J Bone Miner Res 20(2): 318-29.

[000667] Tabe, Y., L. Jin, e outros. (2007). "Activation of integrin-linked quinase is a critical prosurvival pathway induced in leukemic cells by bone marrow-derived stromal cells." Cancer Res 67(2): 684-94.

[000668] Tachibana, K., S. Hirota, e outros. (1998). "The chemokine receptor CXCR4 is essential for vascularization of the gastrointestinal tract." Nature 393(6685): 591-4.

[000669] Takenaga, M., H. Tamamura, e outros. (2004). "A single treatment with microcapsules containing a CXCR4 antagonist suppresses pulmonary metastasis of murine melanoma." Biochem Biophys Res Commun 320(1): 226-32.

[000670] Tamamura, H., M. Fujisawa, e outros. (2004). "Identification of a CXCR4 antagonist, a T140 analog, as an anti-rheumatoid arthritis agent." FEBS Lett 569(1-3): 99-104.

[000671] Tang Y, Yasuhara T, Hara K, Matsukawa N, Maki M, Yu G, Xu L, Hess DC, Borlongan CV (2007) Transplantation of bone marrow-derived stem cells: a promising therapy for stroke. Cell Transplant 16(2): 159-169

[000672] Tarlinton D, Radbruch A, Hiepe F, Dorner T (2008) Plasma cell differentiation and survival. Curr Opin Immunol 20(2): 162-169

[000673] Tashiro, K., H. Tada, e outros. (1993). "Signal sequence trap: a cloning strategy for secreted proteins and tipo I membrane

proteins." Science 261(5121): 600-3.

[000674] Vadhan-Raj, S., L. J. Murray, e outros. (1997). "Stimulation of megakaryocyte and platelet production by a single dose of recombinant human thrombopoietin in patients with cancer." Ann Intern Med 126(9): 673-81.

[000675] Venkatesan, N., S. J. Kim, e outros. (2003). "Novel phosphoramidite building blocks in synthesis and applications toward modified oligonucleotides." Curr Med Chem 10(19): 1973-91.

[000676] Viardot, A., R. Kronenwett, e outros. (1998). "The human immunodeficiency virus (HIV)-tipo 1 coreceptor CXCR-4 (fusin) is preferentially expressed on the more immature CD34+ hematopoietic stem cells." Ann Hematol 77(5): 193-7.

[000677] Voermans, C, M. L. Kooi, e outros. (2001). "In vitro migratory capacity of CD34+ cells is related to hematopoietic recovery after autologous stem cell transplantation." Blood 97(3): 799-804.

[000678] Wang J, Shiozawa Y, Wang Y, Jung Y, Pienta KJ, Mehra R, Loberg R, Taichman RS (2008) The role of CXCR7/RDC1 as a chemokine receptor for CXCL12/SDF-1 in prostate cancer. J Biol Chem 283(7): 4283-4294

[000679] Wang, J., E. Guan, e outros. (2001). "Role of tyrosine phosphorylation in ligand-independent sequestration of CXCR4 in human primary monocytes-macrophages." J Biol Chem 276(52): 49236-43.

[000680] Wang, N., Q. L. Wu, e outros. (2005). "Expression of chemokine receptor CXCR4 in nasopharyngeal carcinoma: pattern of expression and correlation with clinical outcome." J Transl Med 3: 26.

[000681] Wijdenes J, Vooijs WC, Clement C, Post J, Morard F, Vita N, Laurent P, Sun RX, Klein B, Dore JM (1996) A plasmocyte selective monoclonal antibody (B-B4) recognizes syndecan-1. Br J Haematol 94(2): 318-323

[000682] Wincott F, DiRenzo A, Shaffer C, Grimm S, Tracz D, Workman C, Sweedler D, Gonzalez C, Scaringe S, Usman N (1995). Synthesis, deprotection, analysis and purification of RNA and ribozymes. Nucleic Acids Res. 23(14):2677-84.

[000683] Xu, J., A. Mora, e outros. (2007). "Role of the SDF-1/CXCR4 axis in the pathogenesis of lung injury and fibrosis." Am J Respir Cell Mol Biol 37(3): 291-9.

[000684] Yamaguchi, J., K. F. Kusano, e outros. (2003). "Stromal cell-derived factor-1 effects on ex vivo expanded endothelial progenitor cell recruitment for ischemic neovascularization." Circulation 107(9): 1322-8.

[000685] Yamaji-Kegan, K., Q. Su, e outros. (2006). "Hypoxia-induced mitogenic factor has proangiogenic and proinflammatory effects in the lung via VEGF and VEGF receptor-2." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 291(6): LI 159-68.

[000686] Yang J, Zhang B, Lin Y, Yang Y, Liu X, Lu F (2008) Breast cancer metastasis suppressor 1 inhibits SDF-1 alpha-induced migration of non-small cell lung cancer by decreasing CXCR4 expression. Cancer Lett

[000687] Yasumoto, K., K. Koizumi, e outros. (2006). "Role of the CXCL12/CXCR4 axis in peritoneal carcinomatosis of gastric cancer." Cancer Res 66(4): 2181-7.

[000688] Zagzag D, Esencay M, Mendez O, Yee H, Smirnova I, Huang Y, Chiriboga L, Lukyanov E, Liu M, Newcomb EW (2008) Hypoxia- and vascular endothelial growth factor-induced stromal cell-derived factor-lalpha/CXCR4 expression in glioblastomas: one plausible explanation of Scherer's structures. Am J Pathol 173(2): 545-560

[000689] Zeelenberg, I. S., L. Ruuls-Van Stalle, e outros. (2001). "Retention of CXCR4 in the endoplasmic reticulum blocks

dissemination of a T cell hybridoma." J Clin Invest 108(2): 269-77.

[000690] Zeelenberg, I. S., L. Ruuls-Van Stalle, e outros. (2003). "The chemokine receptor CXCR4 is required for outgrowth of colon carcinoma micrometastases." Cancer Res 63(13): 3833-9.

[000691] Zhang, X., T. Nakajima, e outros. (2005). "Tissue trafficking patterns of effector memory CD4+ T cells in rheumatoid arthritis." Arthritis Rheum 52(12): 3839-49.

[000692] Zhou, Y., P. H. Larsen, e outros. (2002). "CXCR4 is a major chemokine receptor on glioma cells and mediates their survival." J Biol Chem 277(51): 49481-7.

[000693] Zou, Y. R., A. H. Kottmann, e outros. (1998). "Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development." Nature 393(6685): 595-9.

[000694] As características da presente invenção descritas no relatório descritivo, nas reivindicações e desenhos podem ambas separadamente e em combinação destas serem material para compreensão da invenção em várias formas das mesmas.

REIVINDICAÇÕES

1. Uso de uma molécula de ácido L-nucleico ligada a SDF-1, caracterizado pelo fato de que é para fabricação de um medicamento para o tratamento e/ou prevenção de uma doença selecionada do grupo que consiste em lúpus eritematoso sistêmico, glomerulonefrite e nefropatia diabética,

em que a molécula de ácido nucleico apresenta uma sequência de ácido nucleico, como definida em qualquer uma das SEQ ID NOs: 46 a 56, 61 a 72 e 132.

2. Uso, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a molécula de ácido L-nucleico inibe a migração de leucócitos, células dendríticas e mastócitos.

3. Uso, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que a molécula de ácido nucleico compreende uma modificação, em que a modificação é selecionada do grupo que compreende uma porção HES e uma porção PEG.

<220>

<223> sintético

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(45)

<223> L-RNA

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> 30-kDa-PEG

<400> 240

gcguggugug aucuagaugu auuggcugau ccuagucagg uacgc 45

<210> 241

<211> 45

<212> RNA

<213> Sequência artificial

<220>

<223> sintético

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(45)

<223> L-RNA

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> 40-kDa-PEG

<400> 241

cgcauggacu gauccuaguc gguuauguag aucuagugug gugcg 45

Ácidos nucléicos de ligação de SDG-1 Tipo A

Nome	nt.	Seqüência: 5'-3'	Comp.
192-A10-001	38	GCUGUGAAAGCAACAUGUCAA-UGAAAGGUAGCCGCAGC	
192-G10	38	GCUGUGAAAGUAACAUGUCAA-UGAAAGGUAACCACAGC	<
192-F10	38	GCUGUGAAAGUAACACGUCAA-UGAAAGGUAACCGCAGC	<
192-B11	38	GCUGUGAAAGUAACACGUCAA-UGAAAGGUAACCACAGC	=
192-C9	38	GCUGUAAAAGUAACAUGUCAA-UGAAAGGUAACUACAGC	<
192-E10	38	GCUGUAAAAGUAACAAGUCAA-UGAAAGGUAACUACAGC	<
192-C10	38	GCUGUGAAAGUAACAAGUCAA-UGAAAGGUAACCACAGC	=
192-D11	38	GCAGUGAAAGUAACAUGUCAA-UGAAAGGUAACCACAGC	<
192-G11	38	GCUGUGAAAGUAACAUGUCAA-UGAAAGGUAACCACUGC	<
192-H11	38	GCUAUGAAAGUAACAUGUCAA-UGAAAGGUAACCAUAGC	<
192-D10	38	GCUGCGAAAGCGACAUGUCAA-UGAAAGGUAGCCGCAGC	<<
192-E9	38	GCUGUGAAAGCAACAUGUCAA-UGAAAGGUAGCCACAGC	<<
192-H9	38	GCUGUGAAAGUAACAUGUCAA-UGAAAGGUAGCCGCAGC	<<
191-A6	39	AGCGUGAAAGUAACACGUAAAAUGAAAGGUAACCACGCU	<
Tipo A Fórmula-1	26	AAAGYRACAHGUMAAXUGAAAGGUARC	
Tipo A Fórmula-2	26	AAAGYRACAHGUMAA-UGAAAGGUARC	
Tipo A Fórmula-3	27	AAAGYRACAHGUMAAAUGAAAGGUARC	
Tipo A Fórmula-4	26	AAAGYAACAHGUCAA-UGAAAGGUARC	
Tipo A Fórmula-5-5'		RSHRYR	
Tipo A Fórmula-5-3'		YRYDSY	

Nucleotídeos terminais que podem hibridizar entre si (negrito)

Nucleotídeos que podem principalmente compreender um motive de ligação de SDF

Posição variável ^

nt.: nucleotíeos

Fig. 1

Comp.:= Os clones foram testados como aptâmeros em um ensaio de ligação de competição vs. 192-A10-001

=:= afinidade de ligação igual a 192-A 10-001; <:= afinidade de ligação mais fraca do que 192-A 1-001

«:= afinidade de ligação muito mais fraca do que 192-A 10-001

Fig. 1 continuação

Derivados de Ácido Nucléico de Ligação de SDF Tipo A 192-Al0-001

Nome	nt.	Seqüência 5′-3′	Comp.	PD: K_D [nM]	Biacore: K_D [nM]	TAX IC_{50} [nM]
192-A10-001	38	**GCUGUG**AAAGCAACAUGUCAAUGAAAGGUAGC**CGCAGC**		1.5	1.0	0.1 - 0.2
192-A10-002	36	**CUGUG**AAAGCAACAUGUCAAUGAAAGGUAGC**CGCAG**	=			=
192-A10-003	34	**UGUG**AAAGCAACAUGUCAAUGAAAGGUAGC**CGCA**	<			<
192-A10-004	32	**GUG**AAAGCAACAUGUCAAUGAAAGGUAGC**CGC**	<<			<<
192-A10-005	30	**UG**AAAGCAACAUGUCAAUGAAAGGUAGC**CG**	<<			<<
192-A10-006	28	**G**AAAGCAACAUGUCAAUGAAAGGUAGC**C**	<<<			
192-A10-007	26	AAAGCAACAUGUCAAUGAAAGGUAGC	i.a.			

nucleotídeos terminais na extremidade 5'-e 3'- que podem hibridizar entre si (negrito)

nucleotídeos que podem principalmente compreender um motive de ligação de SDF

nt.:= nucleotídeos =:= igual

i.a.:= inativo

=:= afinidade de ligação como 192-A10-001

</<</<<<:= mais fraco (<), muito mis fraco («) ou muito muito mais fraco (<«) afinidade de ligação do que 192-Al-001

Comp.:= Clones foram testados como aptâmeros em um ensaio de ligação de competição vs. 193-A10-001

PD.:= Clones foram testados como aptâmeros em um ensaio de ligação de enfraquecimento

TAX:= Clones foram testados como Spiegelmers em um ensaio de quimiotaxia *in vitro* de cultura de célula

Fig. 2A

Derivados de Ácido Nucléico de Ligação de SDF Tipo A1 92-A10-001

	nt.	Seqüência: 5'-3'	Comp.	PD: K_D [nM]	Biacore: K_D [nM]	TAX IC_{50} [nM]
192-A10-001	38	**GCUGUG**AAAGCAACAUGUCAAUGAAAGGUAGC**CGCAGC**		1.5	1.0	0.1 - 0.2
192-A10-002	36	**CUGUG**AAAGCAACAUGUCAAUGAAAGGUAGC**CGCAG**	=			=
192-A10-008	36	**GCGUG**AAAGCAACAUGUCAAUGAAAGGUAGC**CGCGC**	=	1.5	1.4	=
192-A10-015	36	**GCGCG**AAAGCAACAUGUCAAUGAAAGGUAGC**CGCGC**	<	4.6		
192-A10-014	34	**GCGG**AAAGCAACAUGUCAAUGAAAGGUAGC**CCGC**	<	8.0		=
192-A10-016	34	**CGUG**AAAGCAACAUGUCAAUGAAAGGUAGC**CGCG**	<			
192-A10-017	34	**GCGC**AAAGCAACAUGUCAAUGAAAGGUAGC**GUGC**	i.a.			
192-A10-018	34	**GUGC**AAAGCAACAUGUCAAUGAAAGGUAGC**GCGC**	<<<			
192-A10-019	34	**CGCG**AAAGCAACAUGUCAAUGAAAGGUAGC**CGUG**	<<			
192-A10-020	34	**GGGC**AAAGCAACAUGUCAAUGAAAGGUAGC**GCCC**	<<*			
192-A10-021	34	**GGCC**AAAGCAACAUGUCAAUGAAAGGUAGC**GGCC**	<<*			
192-A10-022	34	**GCCC**AAAGCAACAUGUCAAUGAAAGGUAGC**GGGC**	<<*			
192-A10-023	34	**CCCC**AAAGCAACAUGUCAAUGAAAGGUAGC**GGGG**	<<*			

nucleotídeos terminais na extremidade 5'- e 3'- que podem hibridizar entre si (negrito)

nt.:= nucleotídeos

nucleotídeos que podem principalmente compreender um motive de ligação de SDF

i.a.:= inativo

=:= ligação igual como 192-A10-001/ -008

</<</<<:= mais fraco (<), muito mais fraco («) ou muito muito mais fraco (<«) afinidade de ligação do que 192-Al-OOl/ -008

Comp.:= Clones foram testados como aptâmeros em um ensaio de ligação de competição vs. 192-A10-001 (* = exceto de 192-A10-020, -021, -022, e -023 que foram testados vs. 193-A10-008 que tem a afinidade de ligação idêntica a SDF-1 como 192-A10-001)

PD.:= Clones foram testados como aptâmeros em um ensaio de ligação de enfraquecimento

TAX:= Clones foram testados como Spiegelmers em um ensaio de quimiotaxia *in vitro* de cultura de célula

Fig. 2B

Ácidos nucléicos de ligação de SDF-1 Tipo B

Nome	nt.	Seqüência: 5'-3'	Comp.
193-C2-001	47	**AGCGUG**GUGUGAUCUAGAUGUAGUGGCUGAUCCUAGUCAGG**UACGCU**	+
193-G2-001	47	**AGCGUG**GUGUGAUCUAGAUGUAUUGGCUGAUCCUAGUCAGG**UACGCU**	+
193-F2-001	47	**AGCGUG**GUGUGAUCUAGAUGUAAUGGCUGAUCCUAGUCAGG**UGCGCU**	+
193-G1-002	45	**GCGAG**GUGUGAUCUAGAUGUAGUGGCUGAUCCUAGUCAGG**UGCGC**	<<
193-D2-002	45	**GCGUG**GUGUGAUCUAGAUGUAGUGGCUGAUCCUAGUCAGG**UGCGC**	<
193-A1-002	45	**GCAUG**GUGUGAUCUAGAUGUAGUGGCUGAUCCUAGUCAGG**UGCCC**	<<<
193-D3-002	45	**GCGUG**GUGUGAUCUAGAUGUAAUGGCUGAUCCUAGUCAGG**GACGC**	<
193-B3-002	45	**GCGUG**GUGUGAUCUAGAUGUAGAGGCUGAUCCUAGUCAGG**UACGC**	<<
193-H3-002	45	**GCGUG**GUGUGAUCUAGAUGUAAAGGCUGAUCCUAGUCAGG**UACGC**	<
193-E3-002	45	**GCGUG**GUGUGAUCUAGAUGUAGUGGCUGUUCCUAGUCAGG**UAUGC**	<<
193-D1-002	45	**GCGUG**GUGUGAUCUAGAUGUAGUGGCUGAUCCUAGUUAGG**UACGC**	<<<
Tipo B Fórmula-1	35	GUGUGAUCUAGAUGUADWGGCUGWUCCUAGUYAGG	
Tipo B Fórmula-2	35	GUGUGAUCUAGAUGUADUGGCUGAUCCUAGUCAGG	
Tipo B Fórmula-3-5'		X_1GCRWG	
Tipo B Fórmula-3-3'		KRYSCX_4	

nucleotídeos terminais que podem hibridizar entre si (negrito)

nucleotídeos que podem principalmente compreender um motivo de ligação de SDF

nt.:= nucleotídeos posição variável

Comp.:= Clones C2, G2, e F2 foram testados como aptâmeros em um ensaio de ligação de competição vs. 192-A10-001; todos os outros clones foram testados como aptâmeros em um ensaio de ligação de competição vs. 193-G2-012 que tem afinidade de ligação idêntica a SDF-1 como 193-G2-001 (ver Fig. 4B)

+:= melhor afinidade de ligação do que 192-A10-001

</«/<«:= mais fraco (<), muito mais fraco («) ou muito muito mais fraco (<«) afinidade de ligação do que 193-G2-001/-012

X_1 = 'A' ou ausente **X_4** = 'U' ou ausente

Fig. 3

Derivados de Ácidos Nucléicos de Ligação de SDF Tipo B 193-C2/G2-001

Nome	nt.	Seqüência: 5′-3′	Comp.	PD K_D [nM]	Biacore K_D [nM]
193-G2-001	47	**AGCGUG**GUGUGAUCUAGAUGUAUUGGCUGAUCCUAGUCAGG**UACGCU**		0.3	0.5
193-C2-001	47	**AGCGUG**GUGUGAUCUAGAUGUAGUGGCUGAUCCUAGUCAGG**UACGCU**	=		0.6
193-C2-002	45	**GCGUG**GUGUGAUCUAGAUGUAGUGGCUGAUCCUAGUCAGG**UACGC**	=		0.8
193-C2-003	43	**CGUG**GUGUGAUCUAGAUGUAGUGGCUGAUCCUAGUCAGG**UACG**	<		
193-C2-004	41	**GUG**GUGUGAUCUAGAUGUAGUGGCUGAUCCUAGUCAGG**UAC**	<<		
193-C2-005	39	**UG**GUGUGAUCUAGAUGUAGUGGCUGAUCCUAGUCAGG**UA**	<<<		
193-C2-006	37	**G**GUGUGAUCUAGAUGUAGUGGCUGAUCCUAGUCAGG**U**	<<<		
193-C2-007	35	GUGUGAUCUAGAUGUAGUGGCUGAUCCUAGUCAGG	i.a.		

nucleotídeos terminais na extremidade 5'- e 3' que podem hibridizar entre si (negrito)

nucleotídeos que podem principalmente compreender um motive de ligação de SDF

nt.:= nucleotídeos =:= igual

=:= afinidade de ligação as 193-G2-001

</<</<<:= mais fraco (<), muito mais fraco («) ou muito muito mais fraco (<«) afinidade de ligação do que 193-G2-001

Comp.:= Clones foram testados como aptâmeros em um ensaio de ligação de competição vs. 193-G2-001

PD.:= Clones foram testados como aptâmeros em um ensaio de ligação de enfraquecimento

Fig. 4A

Derivados de Ácido Nucléico de Ligação de SDF Tipo B 193-C2/G2-001

Nome	nt.	Seqüência: 5'-3'	Comp.	PD K_D [nM]	Biacore K_D [nM]
193-G2-001	47	**AGCGUG**GUGUGAUCUAGAUGUAUUGGCUGAUCCUAGUCAGG**UACGCU**		0.3	0.5
193-G2-012	45	**GCGUG**GUGUGAUCUAGAUGUAUUGGCUGAUCCUAGUCAGG**UACGC**	=	0.3	
193-G2-013	45	**GCGCG**GUGUGAUCUAGAUGUAUUGGCUGAUCCUAGUCAGG**CGCGC**	<<	5.3	
193-G2-014	43	**GCGC**GUGUGAUCUAGAUGUAUUGGCUGAUCCUAGUCAGG**GCGC**	<<	4.7	
193-G2-015	43	**GGGC**GUGUGAUCUAGAUGUAUUGGCUGAUCCUAGUCAGG**GCCC**	<<*	4.5	
193-G2-016	43	**GGCC**GUGUGAUCUAGAUGUAUUGGCUGAUCCUAGUCAGG**GGCC**	<<*	4.2	
193-G2-017	43	**GCCC**GUGUGAUCUAGAUGUAUUGGCUGAUCCUAGUCAGG**GGGC**	<<*	4.2	

nucleotídeos terminais na extremidade 5'- e 3'- que podem hibridizar entre si (negrito)

nucleotídeos que podem principalmente compreender um motivo de ligação de SDF

nt.:= nucleotídeos

i.a.:= inativo

=:= afinidade de ligação igual como 193-G2-001/ -012

</«/<«:= mais fraco (<), muito mais fraco («) ou muito muito mais fraco (<«) afinidade de ligação do que 193-G2-001 e 193-G2-012, respectivamente

Comp.:= Clones foram testados como aptâmeros em um ensaio de ligação de competição vs. 193-G2-001 (* = exceto de 193-G2-015, -016, -017 que foram testados em um ensaio de ligação de competição vs. 193-G2-012 que tem afinidade de ligação idêntica a SDF-1 como 193-G2-001)

PD.:= Clones foram testados como aptâmeros em um ensaio de ligação de enfraquecimento

Fig. 4B

Ácidos nucléicos de ligação de SDF-1 Tipo C

Nome	nt.	Seqüência : 5′-3′	Comp.
197-B2	39	**GUGCUGCGGG**GGUUAGGGCUAGAAGUCGG**CCUGCAGCAC**	<
191-D5-001	39	**AGCGUGGCGA**GGUUAGGGCUAGAAGUCGG**UCGACACGCU**	<
197-H1	39	**GUGUUGCGGA**GGUUAGGGCUAGAAGUCGG**UCAGCAGCAC**	<
190-D3	48	**CGUGCGGCCUAAGA**GGUUAGGGCUUAAAGUCGG**UCUUUGGCCAACACG**	<<
190-A3-001	48	**CGUG**CGCUUGAGAUAGGGGUUAGGGCUUAAAGUCGGCUGAUUCU**CACG**	<
190-A3-001*	48	CGUGCGCU**UGAGA**UAGGGGUUAGGGCUUAAAGUCGGCUGAU**UCUCA**CG	<
190-A2	48	**CGUGAUUGG**UGA**GG**GGUUAGGGCUUGAAGUCGG**CCUUGUCCAGUCACG**	<<
191-A5	39	**AGCGUGAAGG**GGUUAGGGCUCGAAGUCGG**CUGACACGCU**	<<
197-H3	39	**GUGCUGCGGG**GGUUAGGGCUCGAAGUCGG**CCCGCAGCAC**	<
197-B1	39	**GUGUUCCCGG**GGUUAGGGCUUGAAGUCGG**CCGGCAGCAC**	<<
197-E3	39	**GUGUUGCAGG**GGUUAGGGCUUGAAGUCGG**CCUGCAGCAC**	<
197-H2	39	**GUGCUGCGGG**GGUUAGGGCUCAAAGUCGG**CCUGCAGCAC**	<<
197-D1	38	**GUGCUG**CCGGGGUUAGGGCUAA-AGUCGG**CCGACAGCAC**	<<
197-D2	39	**GUGCUGUGGG**GGUCAGGGCUAGAAGUCGG**CCUGCAGCAC**	<<
Tipo C Fórmula-1	19	GGUYAGGGCUHRXAGUCGG	
Tipo C Fórmula-2	18	GGUYAGGGCUHRAAGUCGG	
Tipo C Fórmula-3	19	GGUYAGGGCUHR-AGUCGG	
Tipo C Fórmula-4	19	GGUUAGGGCUHGAAGUCGG	

nucleotídeos terminais que hibridizam entre si (negrito)

nucleotideos que podem principalmente compreender um motivo de ligação de SDF

nt.:= nucleotídeos posição variável Comp.:= Clones foram testados como aptâmeros em um ensaio de ligação de competição vs. 192-A 10-001

=:= afinidade de ligação igual como 192-A10; <:= afinidade de ligação mais fraca do que 192-AlO <<:= muito mais fraco afinidade de ligação do que 192-A 10

*:= hibridização alternativa

Fig. 5

Derivados de Ácido Nucléico de Ligação de SDF Tipo C 190-A3-001

Nome	nt.	Seqüência: 5′-3′	Comp.
190-A3-001	48	**CGUG**CGCUUGAGAUAGG[GGUUAGGGCUUAAAGUCGG]CUGAUUCU**CACG**	
190-A3-001*	48	CGUGCGCU**UGAGA**UAGG[GGUUAGGGCUUAAAGUCGG]**CU**GAU**UCUCA**CG	
190-A3-003	38	**UGAGA**UAGG[GGUUAGGGCUUAAAGUCGG]CUGAU**UCUCA**	=
190-A3-004	36	**GAGA**UAGG[GGUUAGGGCUUAAAGUCGG]**CU**GAU**UCUC**	=
190-A3-007	29	**GG**[GGUUAGGGCUUAAAGUCGG]**CU**GAUUCU	<<<

nucleotídeos terminais na extremidade 5'- e 3' que podem hibridizar entre si (negrito)

nt.:= nucleotídeos

[nucleotídeos que podem principalmente compreender um motivo de ligação de SDF]

i.a.:= inativo **=:=** igual afinidade de ligação como 190-A3-001

</<</<<:= mais fraco (<), muito mais fraco («) ou muito muito mais fraco (<«) afinidade de ligação do que 190-A3-001

Comp.:= Clones foram testados como aptâmeros em um ensaio de ligação de competição vs. 190-A3-001

***:=** hibridização alternativa dos nucleotídeos terminais

Fig. 6

Derivados de Ácido Nucléico de Ligação de SDF Tipo C 191-D5-001

Nome	nt.	Seqüência : 5'-3'	Comp. vs. 191-D5-001	Comp. vs. 191-D5-007	Biacore K_D [nM]
191-D5-001	39	**AGCGUGGCGA**GGUUAGGGCUAGAAGUCGG**UCGACACGCU**		<	0.73
191-D5-002	37	**GCGUGGCGA**GGUUAGGGCUAGAAGUCGG**UCGACACGC**	=		
191-D5-003	35	**CGUGGCGA**GGUUAGGGCUAGAAGUCGG**UCGACACG**	=		
191-D5-004	33	**CG-GGCGA**GGUUAGGGCUAGAAGUCGG**UCGAC-CG**	<		
191-D5-005	33	**CG-GGCGA**GGUUAGGGCUAGAAGUCGG**UCGCC-CG**	=		
191-D5-006	31	**CG--GCGA**GGUUAGGGCUAGAAGUCGG**UCGC--CG**	=		
191-D5-007	29	**CG--G-GA**GGUUAGGGCUAGAAGUCGG**UC-C--CG**	+		0.75
191-D5-010	27	**G--G-GA**GGUUAGGGCUAGAAGUCGG**UC-C--C**		<	

nucleotídeos terminais na extremidade 5'- e 3' que podem hibridizar entre si (negrito)

nt.:= nucleotídeos

nucleotideos que podem principalmente compreender um motivo de ligação de SDF

i.a.:= inativo **=:=** igual afinidade de ligação as 191-D5-001/ -007

</<</<<:= mais fraco (<), muito mais fraco («) ou muito muito mais fraco (<«) afinidade de ligação do que 191-D5-001/ -007

Comp.:= Clones foram testados como aptâmeros em um ensaio de ligação de competição vs. 191-D5-001 ou 191-D5-007 onde ambos os clones tem afinidade de ligação idêntica a SDF-1 como 191-D5-001

Fig. 7A

Derivados de Ácido Nucléico de Ligação de SDF Tipo C 191-D5-001

Nome	nt.	Seqüência : 5'-3'	Comp. vs. 191-D5-007
191-D5-007	29	CG--G-GAGGUUAGGGCUAGAAGUCGGUC-C--CG	
191-D5-010	27	G--G-GAGGUUAGGGCUAGAAGUCGGUC-C--C	<
191-D5-017	27	CCGCGGUUAGGGCUAGAAGUCGGGCGG	<
191-D5-029	27	CCCGGGUUAGGGCUAGAAGUCGGCGGG	<
191-D5-024	27	GGCGGGUUAGGGCUAGAAGUCGGCGCC	<
191-D5-017-29a	29	CCCGCGGUUAGGGCUAGAAGUCGGGCGGG	<
191-D5-017-29b	29	GCCGCGGUUAGGGCUAGAAGUCGGGCGGC	<
191-D5-019-29a	29	CCCCGGGUUAGGGCUAGAAGUCGGCGGGG	<
191-D5-024-29a	29	CGGCGGGUUAGGGCUAGAAGUCGGCGCCG	=
191-D5-024-29b	29	GGGCGGGUUAGGGCUAGAAGUCGGCGCCC	=

nucleotídeos terminais na extremidade 5'- e 3' que podem hibridizar entre si (negrito)

nucleotídeos que podem principalmente compreender um motivo de ligação de SDF

nt.:= nucleotídeos

i.a.:= inativo

=:= igual afinidade de ligação as 191-D5-007

</<</<<:= mais fraco (<), muito mais fraco («) ou muito muito mais fraco (<«) afinidade de ligação do que 191-D5-007

Comp.:= foram testados como aptâmeros em um ensaio de ligação de competição vs. 191-D5-007

Fig. 7B

Derivados de Ácido Nucléico de Ligação de SDF Tipo C I97-B2

Nome	nt.	Seqüência : 5′-3′	Comp.vs. 197-B2	Comp. vs. 191-D5-007	Biacore K_D [nM]	TAX IC_{50}[nM]
197-B2	39	GUGCUGCGGGGGUUAGGGCUAGAAGUCGGCCUGCAGCAC		=	0.9	0.1-0.2
197-B2-001	37	UGCUGCGGGGGUUAGGGCUAGAAGUCGGCCUGCAGCA	=		1.1	
197-B2-002	35	GCUGCGGGGGUUAGGGCUAGAAGUCGGCCUGCAGC	=			
197-B2-003	33	CUGCGGGGGUUAGGGCUAGAAGUCGGCCUGCAG	=			
197-B2-004	31	UGCGGGGGUUAGGGCUAGAAGUCGGCCUGCA	=			
197-B2-005	29	GCGGGGGUUAGGGCUAGAAGUCGGCCUGC	=			
197-B2-006	29	GCCGGGGUUAGGGCUAGAAGUCGGCCGGC	=	=		0.1-0.2
197-B2-006-31a	31	GGCCGGGGUUAGGGCUAGAAGUCGGCCGGCC		=		
197-B2-006-31b	31	CGCCGGGGUUAGGGCUAGAAGUCGGCCGGCG		=		

nucleotídeos terminais na extremidade 5'- e 3' que podem hibridizar entre si (negrito)

nucleotídeos que podem principalmente compreender um motivo de ligação de SDF

nt.:= nucleotídeos

i.a.:= inativo

=:= igual afinidade de ligação como 197-B2 ou 191-D5-007

</<</<<:= mais fraco (<), muito mais fraco («) ou muito muito mais fraco (<«) afinidade de ligação do que 197-B2 ou 191-D5-007

Comp.:= Clones foram testados como aptâmeros em um ensaio de ligação de competição vs. 197-B2 ou 191-D5-007 onde ambos os clones têm afinidade de ligação idêntica a SDF-1

TAX:= Clones foram testados como Spiegelmers em um ensaio de quimiotaxia de cultura de célula *in vitro*

Fig. 8

Ácidos Nucléicos de Ligação de SDF-1 Adicionais

Nome	nt.	Seqüência : 5'-3'	PD K_D [nM]
194-A2-001	48	**CGUGG**UCCGUUGUGUCAGGUCUA**U**UCGCCCCGGUGCAGGGCAU**CCGCG**	12.0
196-B12-003	49	GCAGUGUGACGCGGACGUGAUAGGACAGAGCUGAUCCCGCUCAGGUGAG	7.6
196-B12-004	49	CAACAGCAGUGUGACGCGGACGUGAUAGGACAGAGCUGAUCCCGCUCAG	5.3

nucleotídeos terminais na extremidade 5'- e 3' que podem hibridizar entre si (negrito)

nt.:= nucleotídeos

PD.:= Clones foram testados como aptâmeros em um ensaio de ligação de enfraquecimento

Fig. 9

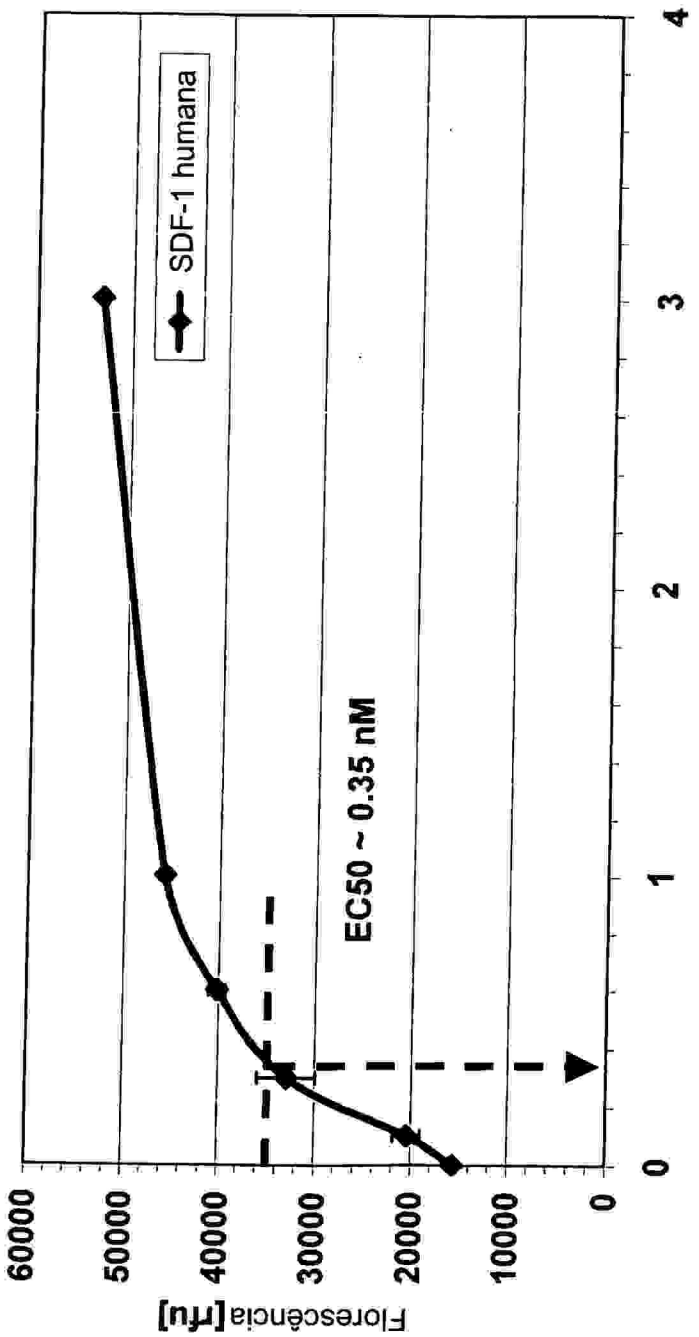

SDF-1 humana
EC50 ~ 0.35 nM
Florescência [rfu]
SDF-1 humana [nM]
0
10000
20000
30000
40000
50000
60000
0
1
2
3
4

Fig. 10

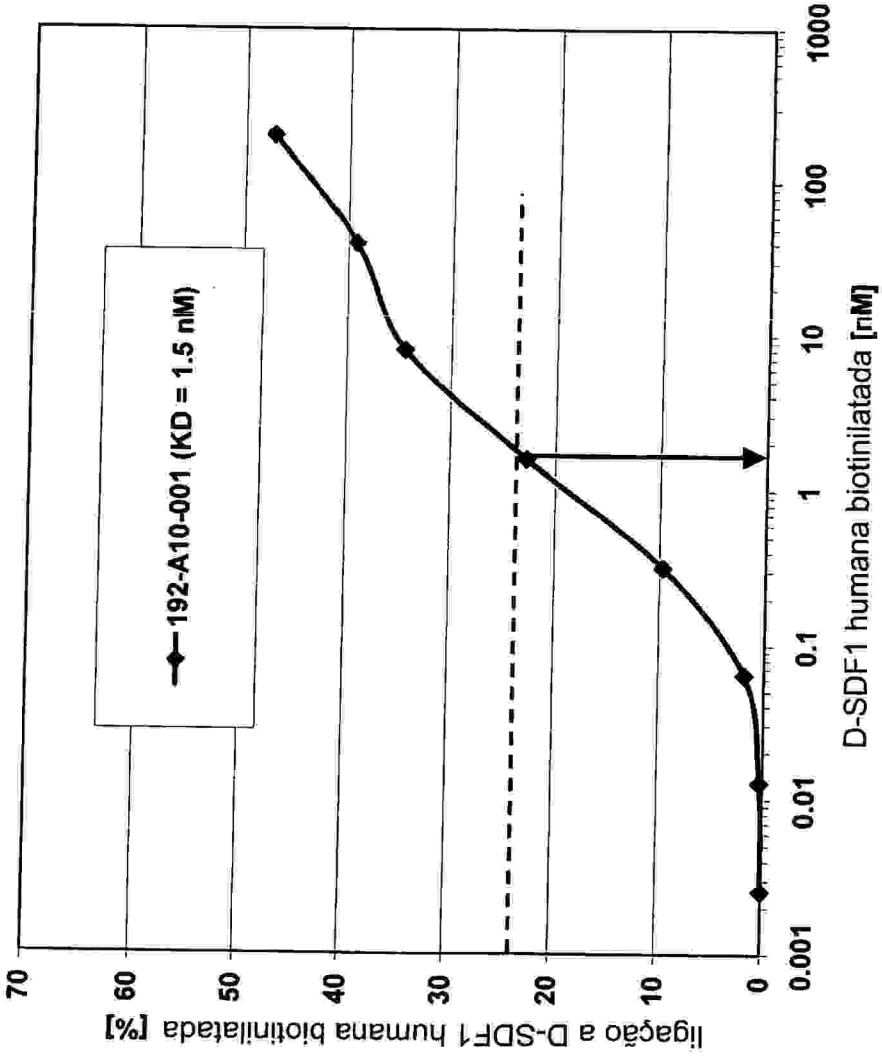

ligação a D-SDF1 humana biotinilatada [%]
70
60
50
40
30
20
10
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
D-SDF1 humana biotinilatada [nM]
192-A10-001 (KD = 1.5 nM)

Fig. 11

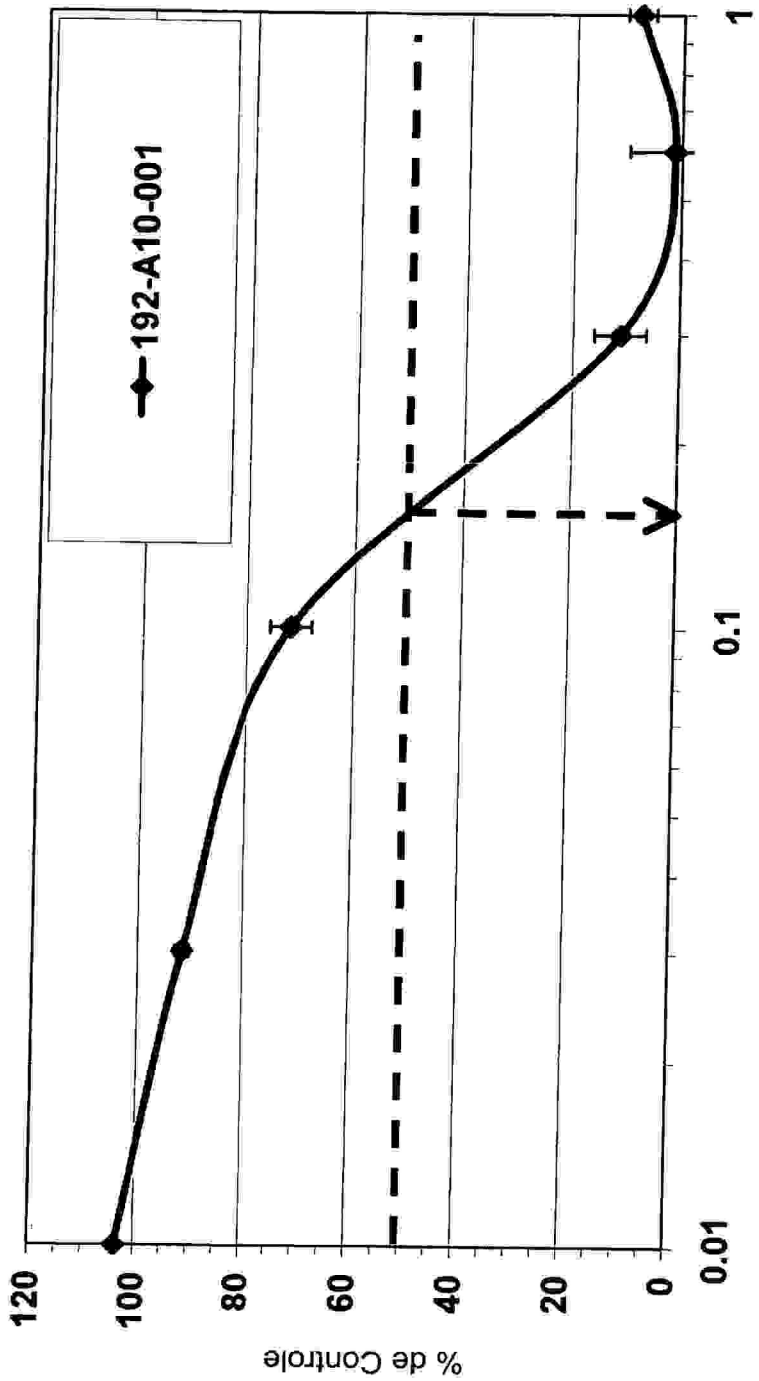
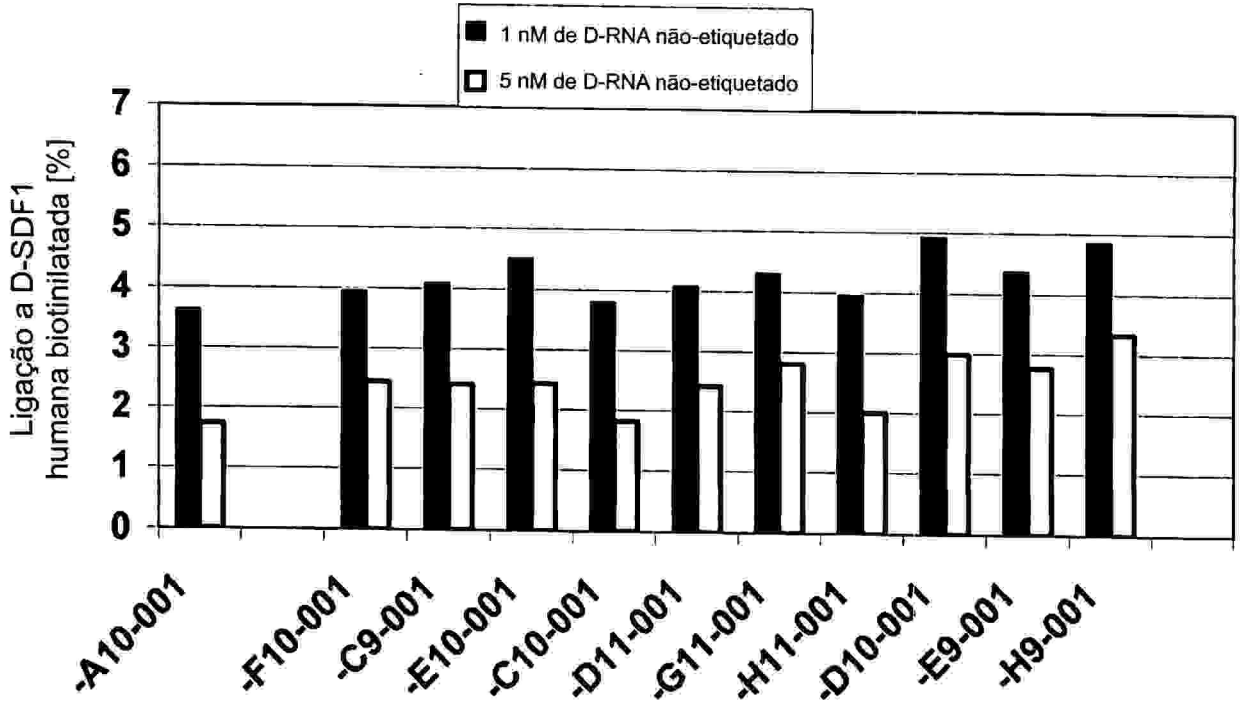

192-A10-001
% de Controle
120
100
80
60
40
20
0
0.01
0.1
1
Spiegelmer [nM]

Fig. 12

Ranqueamento competitivo de ácidos nucléicos de ligação a SDF-1 Tipo A com 0,08 nM de aptâmeros etiquetado 192-A10-001 como referência



Ácidos nucléicos de ligação de SDF-1 Tipo A não-etiquetado (192-)

Fig. 13

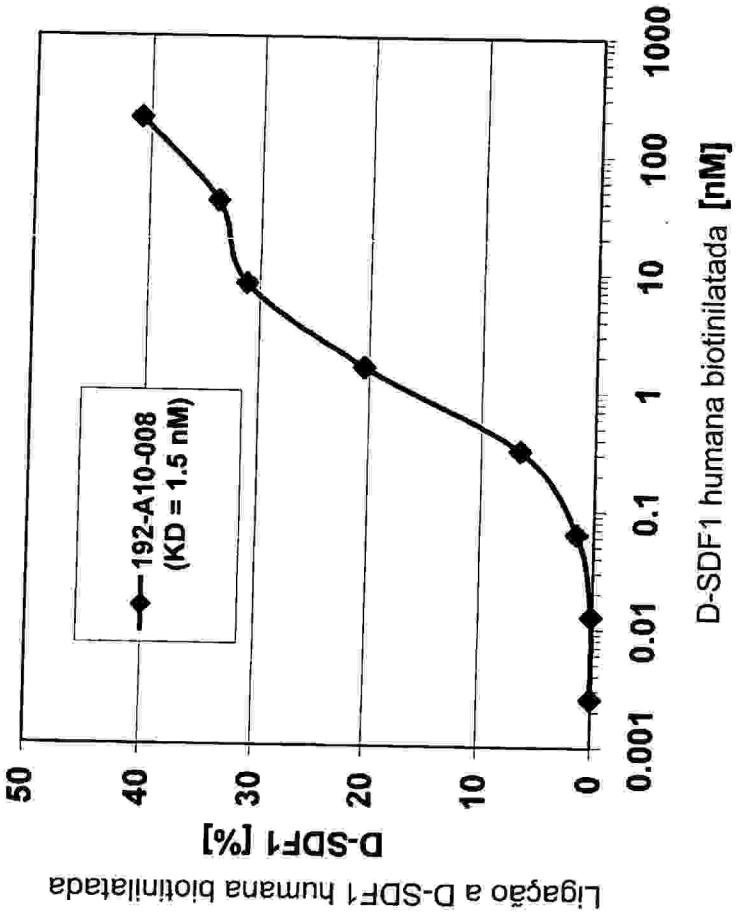
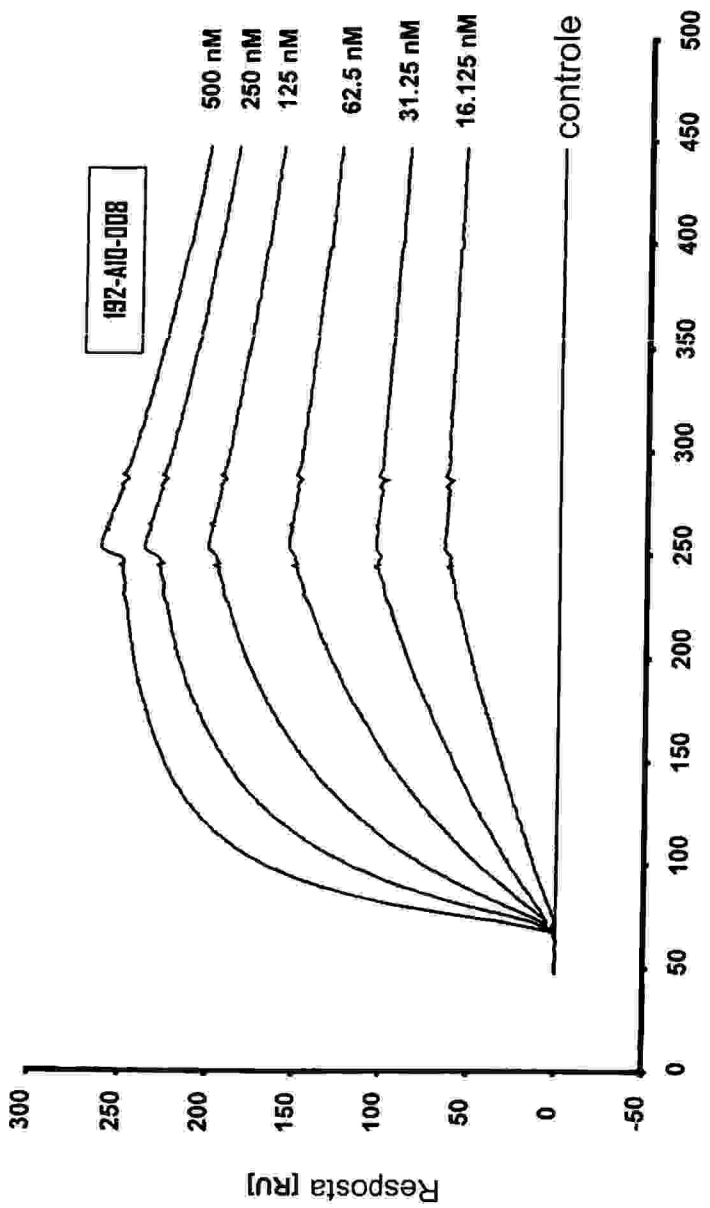

Ligação a D-SDF1 humana biotinilatada
D-SDF1 [%]
50
40
30
20
10
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
D-SDF1 humana biotinilatada [nM]
192-A10-008
(KD = 1.5 nM)

Fig. 14



Spiegelmer	k_a [$M^{-1} \times s^{-1}$]	k_{off} [s^{-1}]	K_D [nM]
192-A10-008	3.83×10^5	5.35×10^{-4}	1.40

Fig. 15

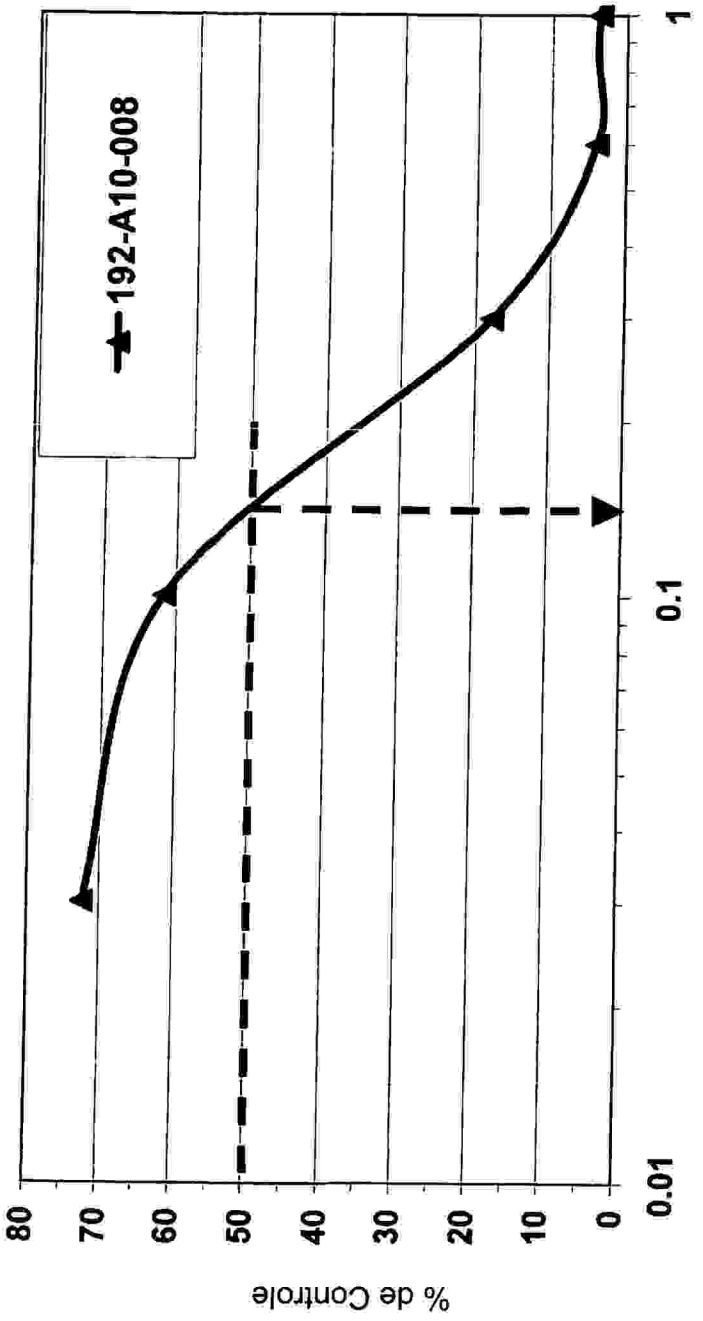
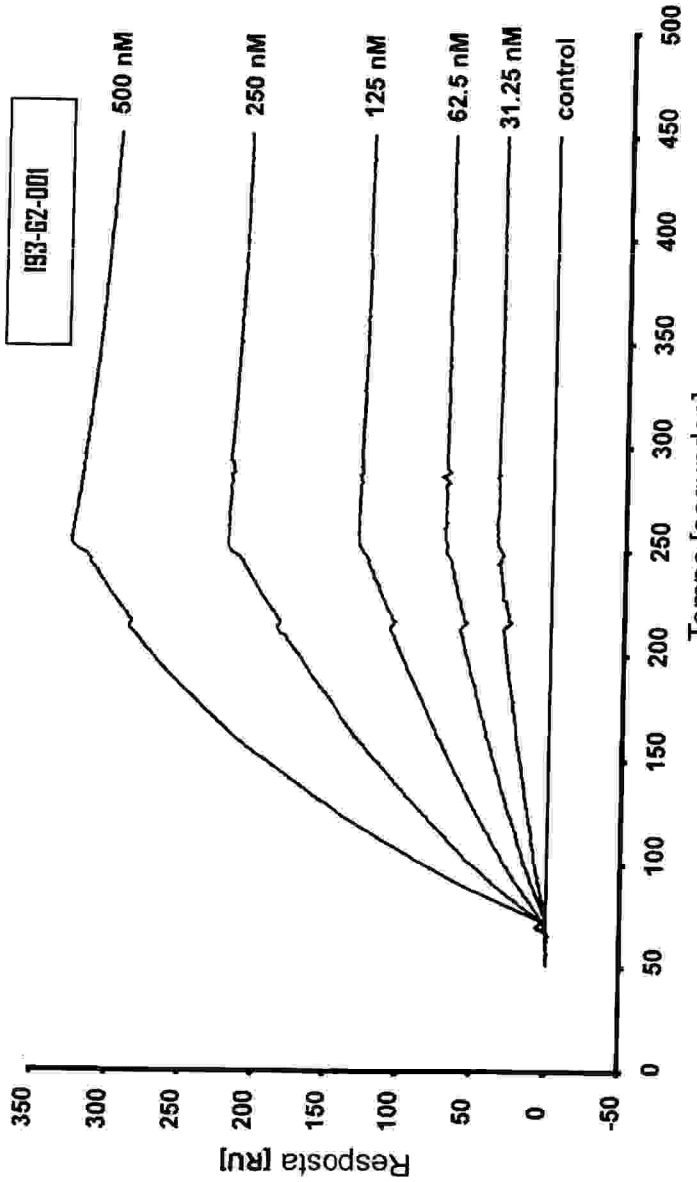

192-A10-008
% de Controle
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0.01
0.1
1
Spiegelmer [nM]

Fig. 16



Spiegelmer	k_a [$M^{-1} \times s^{-1}$]	k_{off} [s^{-1}]	K_D [nM]
193-62-001	2.84×10^5	1.42×10^{-4}	0.50

Fig. 17

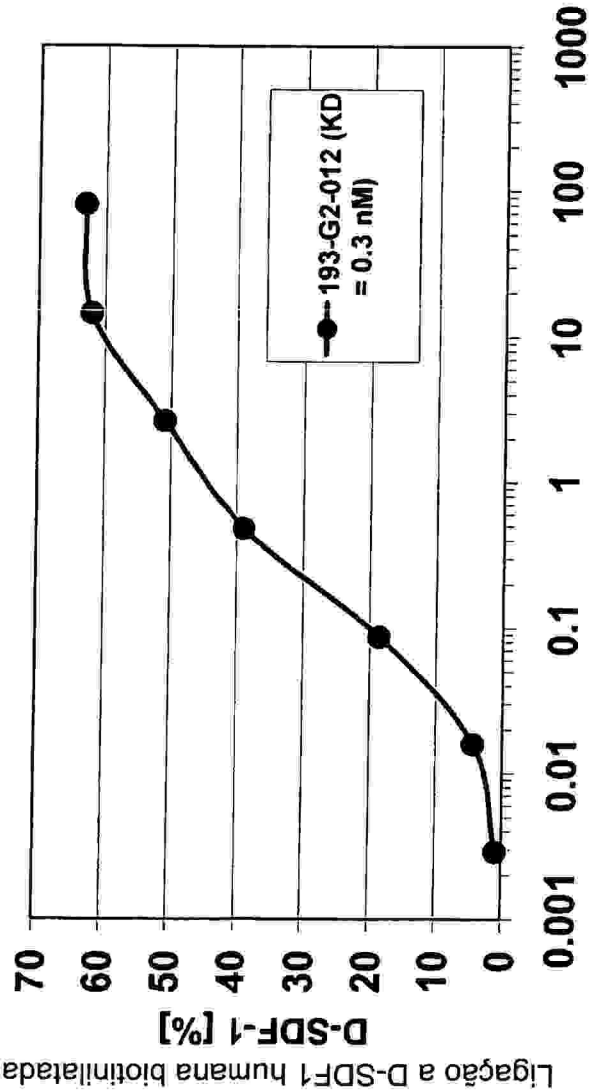

Ligação a D-SDF1 humana biotinilatada
D-SDF-1 [%]
70
60
50
40
30
20
10
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
D-SDF1 humana biotinilatada [nM]
193-G2-012 (KD = 0.3 nM)

Fig. 1B

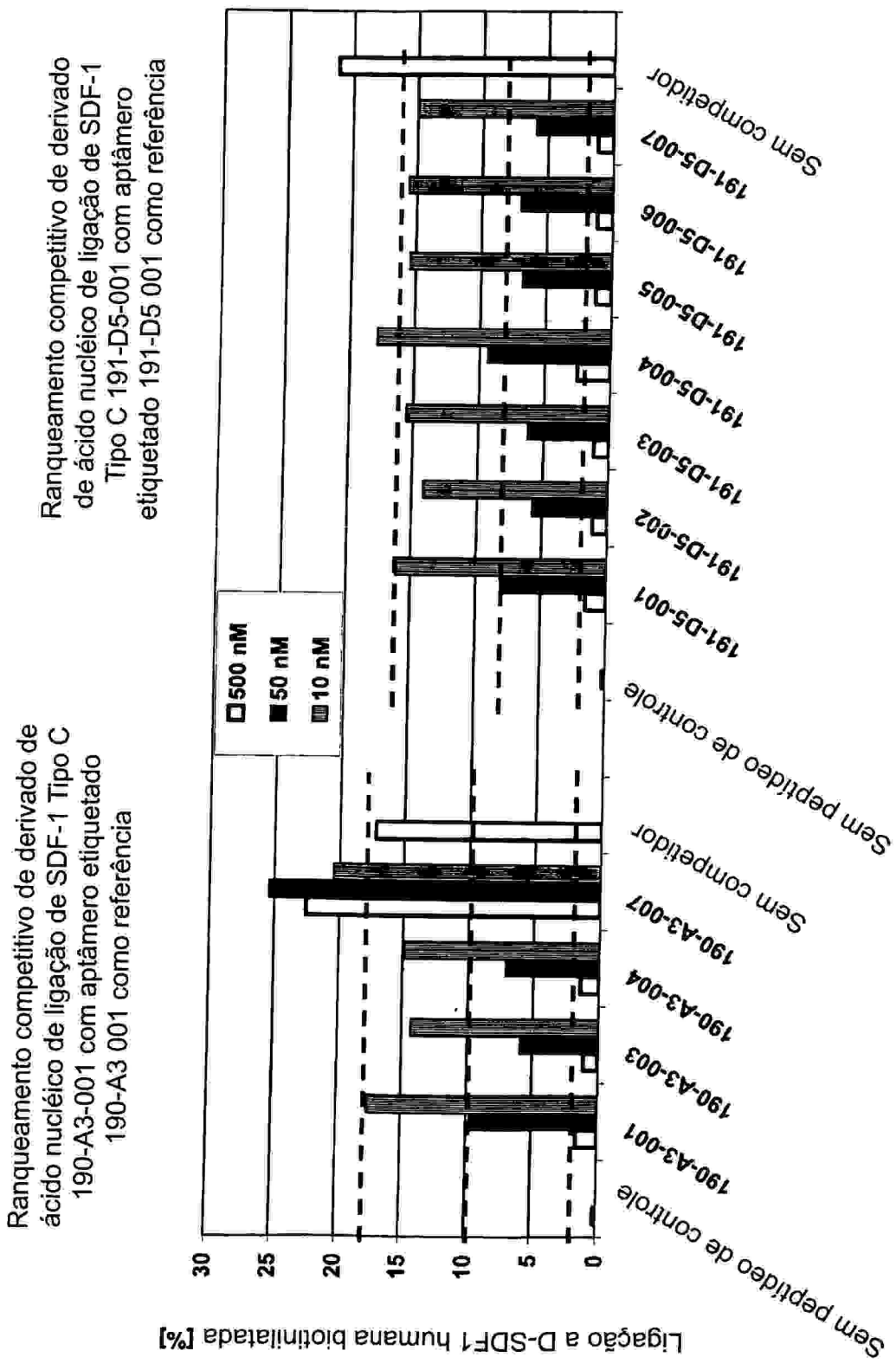

Ranqueamento competitivo de derivado de ácido nucléico de ligação de SDF-1 Tipo C 190-A3-001 com aptâmero etiquetado 190-A3 001 como referência
Ranqueamento competitivo de derivado de ácido nucléico de ligação de SDF-1 Tipo C 191-D5-001 com aptâmero etiquetado 191-D5 001 como referência
500 nM
50 nM
10 nM
Ligação a D-SDF1 humana biotinilatada [%]
30
25
20
15
10
5
0
Sem peptídeo de controle
190-A3-001
190-A3-003
190-A3-004
190-A3-007
Sem competidor
Sem peptídeo de controle
191-D5-001
191-D5-002
191-D5-003
191-D5-004
191-D5-005
191-D5-006
191-D5-007
Sem competidor

Fig. 19

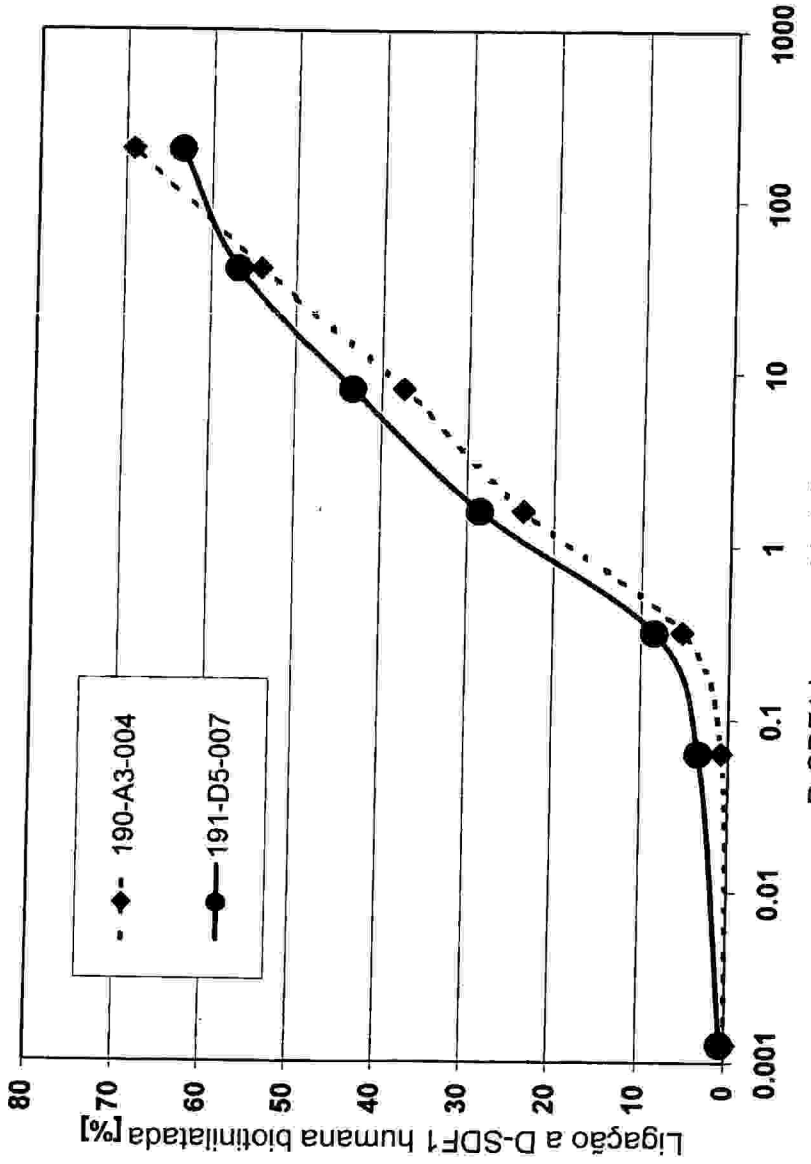
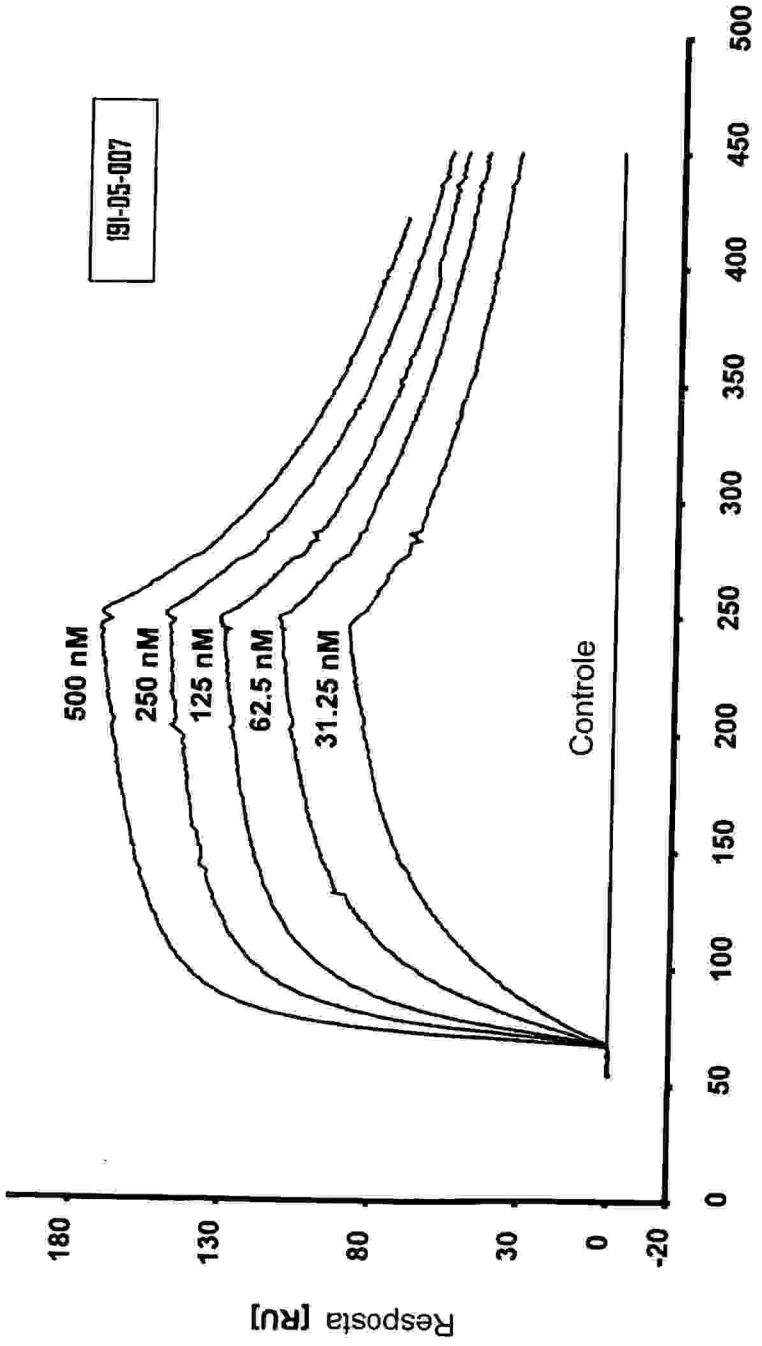

Ligação a D-SDF1 humana biotinilatada [%]
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
D-SDF1 humana biotinilatada [nM]
190-A3-004
191-D5-007

Fig. 20



Spiegelmer	k_a [$M^{-1} \times s^{-1}$]	k_{off} [s^{-1}]	K_D [nM]
191-05-007	2.68 x10^6	2.02 x 10^{-3}	0.75

Fig. 21

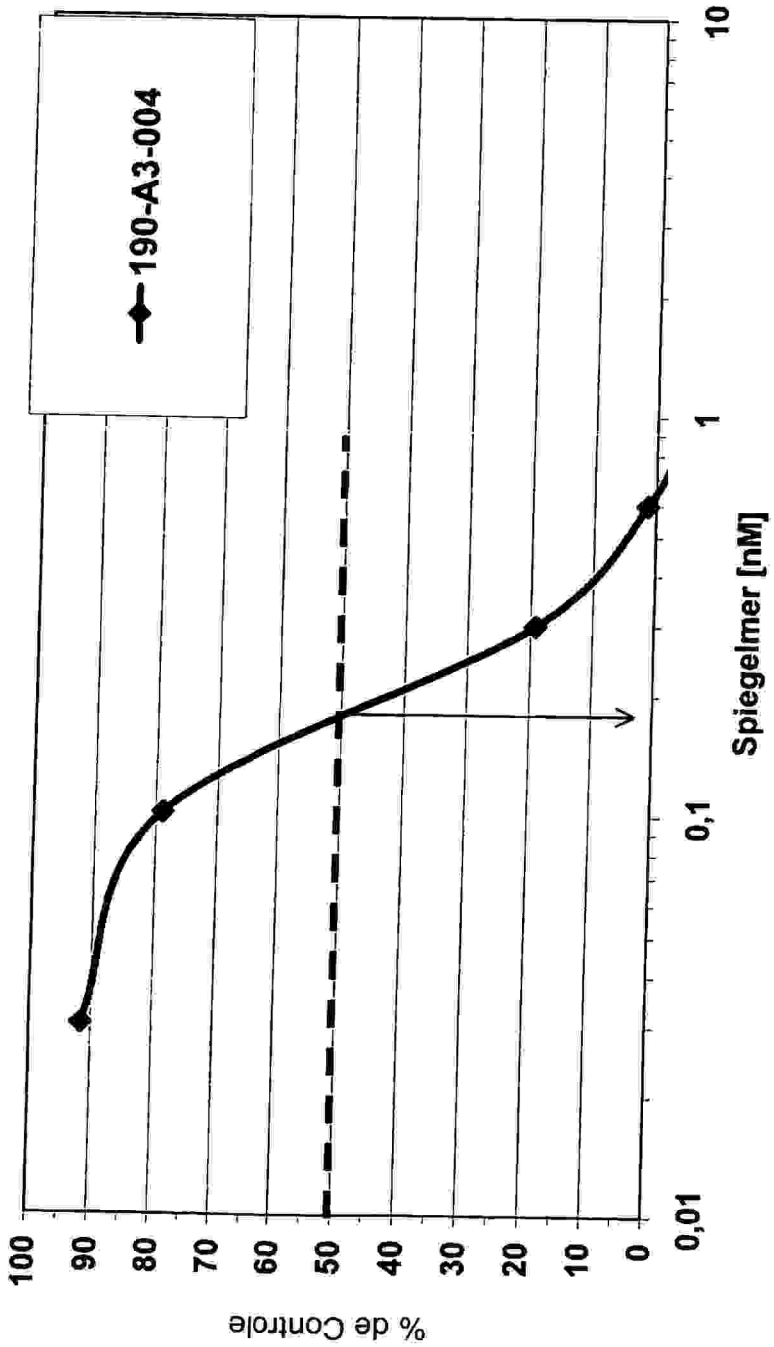

190-A3-004
% de Controle
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0,01
0,1
1
10
Spiegelmer [nM]

Fig. 22

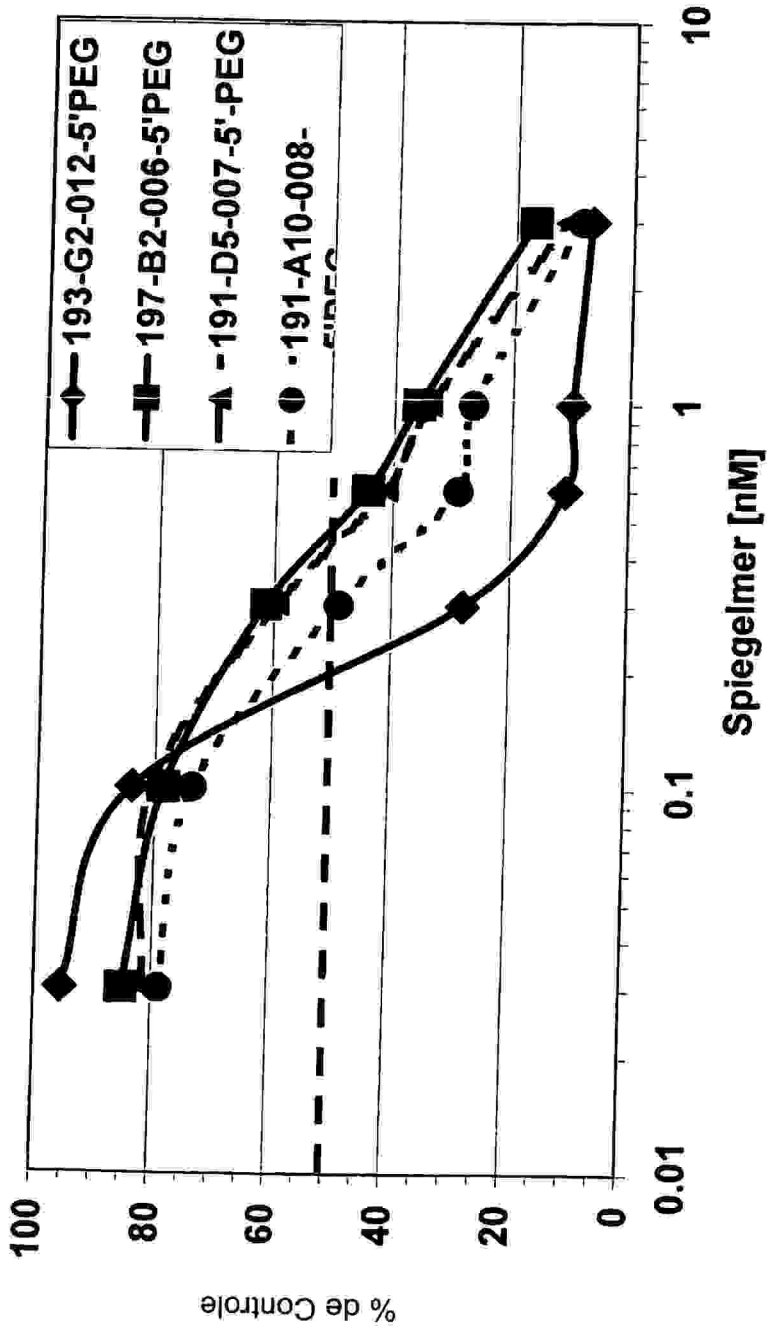

193-G2-012-5'PEG
197-B2-006-5'PEG
191-D5-007-5'-PEG
191-A10-008-
% de Controle
100
80
60
40
20
0
0.01
0.1
1
10
Spiegelmer [nM]

Fig. 23A

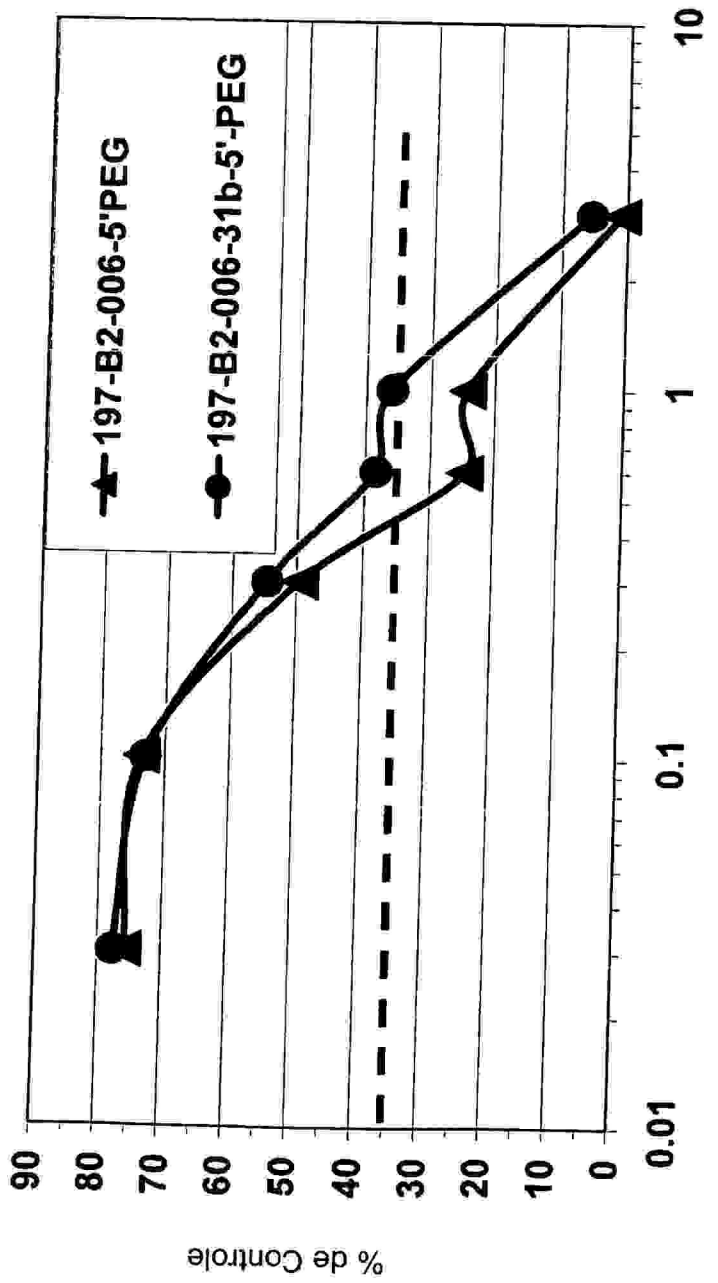
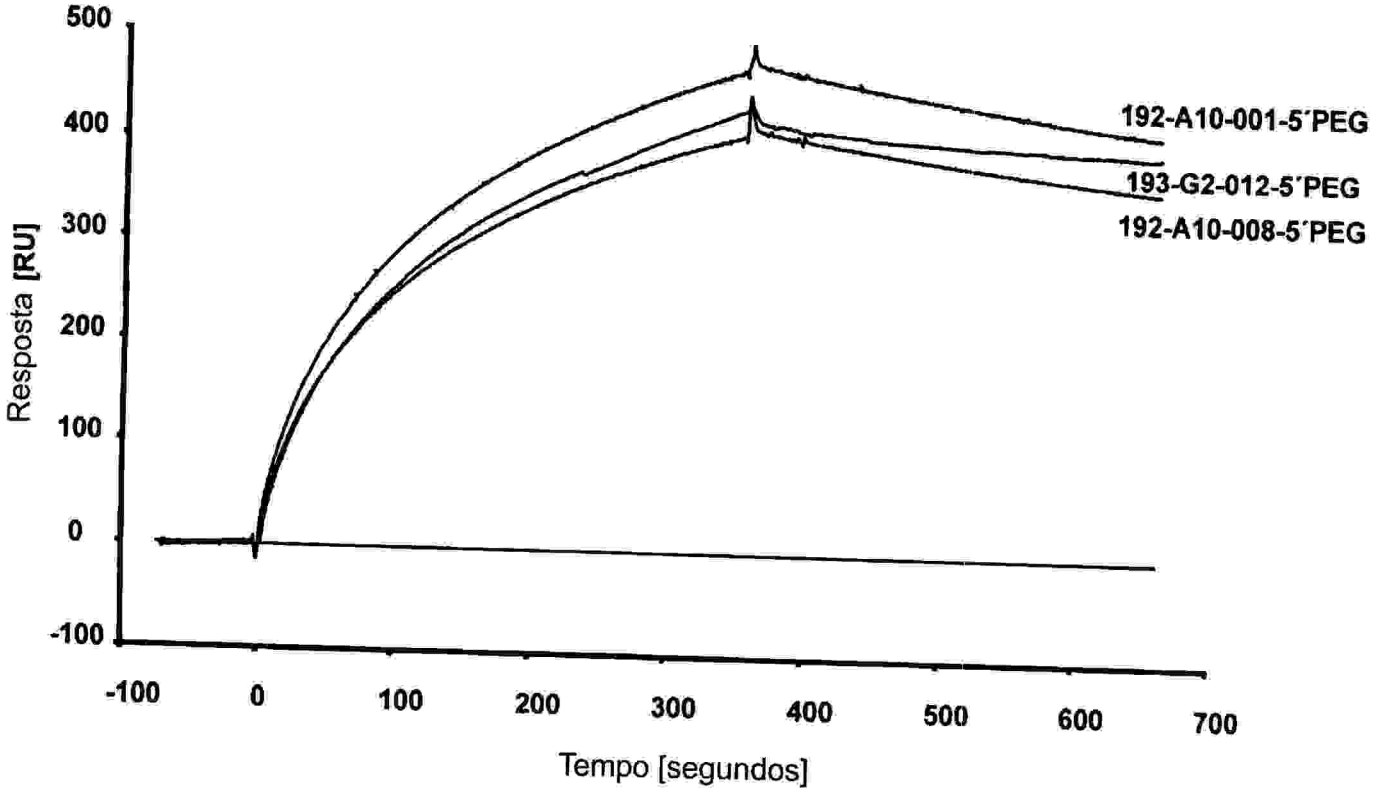
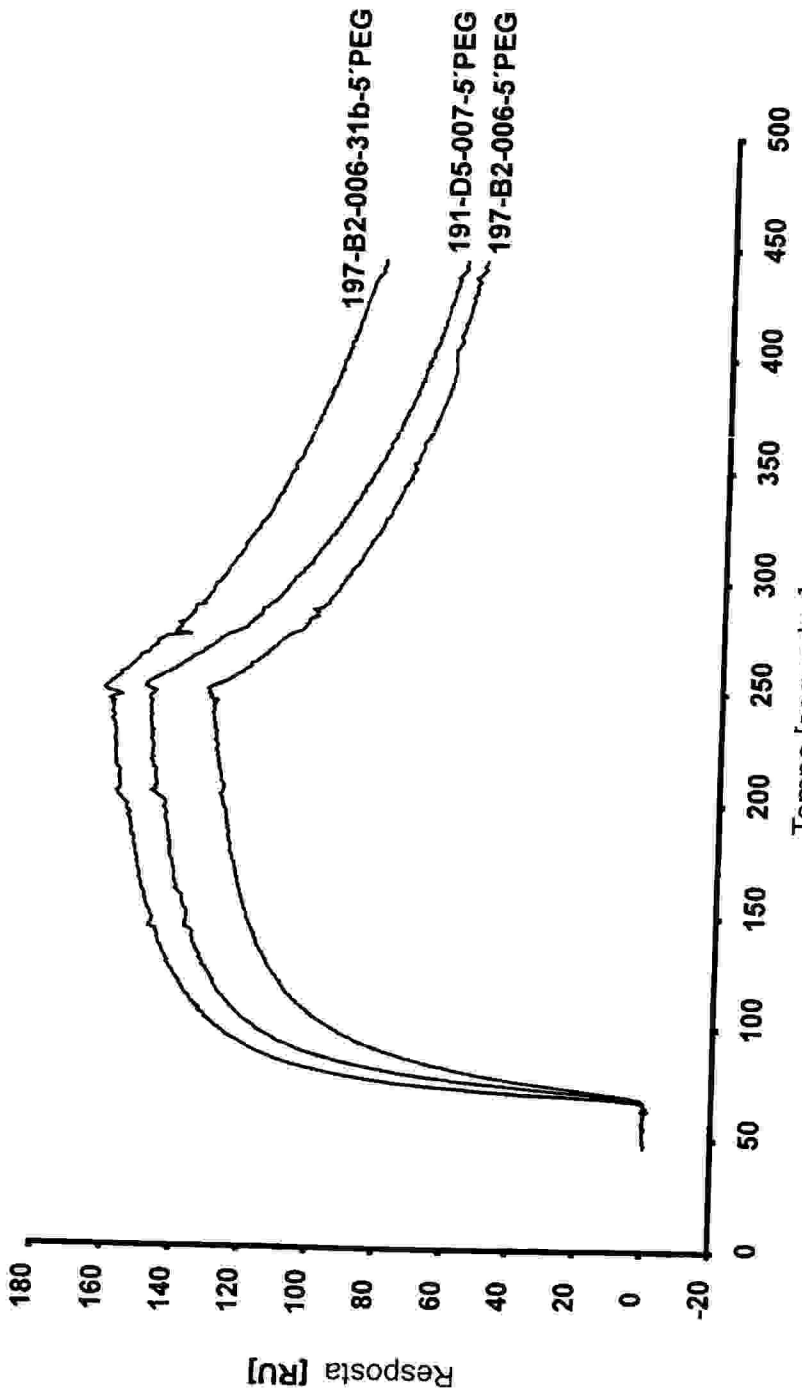

197-B2-006-5'PEG
197-B2-006-31b-5'-PEG
% de Controle
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0.01
0.1
1
10
Spiegelmer [nM]

Fig. 23B



Spiegelmer	k_a [$M^{-1} \times s^{-1}$]	k_{off} [s^{-1}]	K_D [nM]
192-A10-001-5´PEG	2.08×10^5	5.32×10^{-4}	2.55
192-A10-008-5´PEG	1.7×10^5	6.68×10^{-4}	3.92
193-G2-012-5´PEG	3.42×10^5	2.52×10^{-4}	0.74

Fig. 24 A



Spiegelmer	k_a [$M^{-1} \times s^{-1}$]	k_{off} [s^{-1}]	K_D [nM]
191-D5-007-5'PEG	1.8×10^6	4.3×10^{-3}	2.4
	9.05×10^5	5.73×10^{-3}	6.3
197-B2-006-5'PEG	1.47×10^6	4.39×10^{-3}	3.0
197-B2-006-31b-5'PEG	1.96×10^6	3.02×10^{-3}	1.54

Fig. 24B

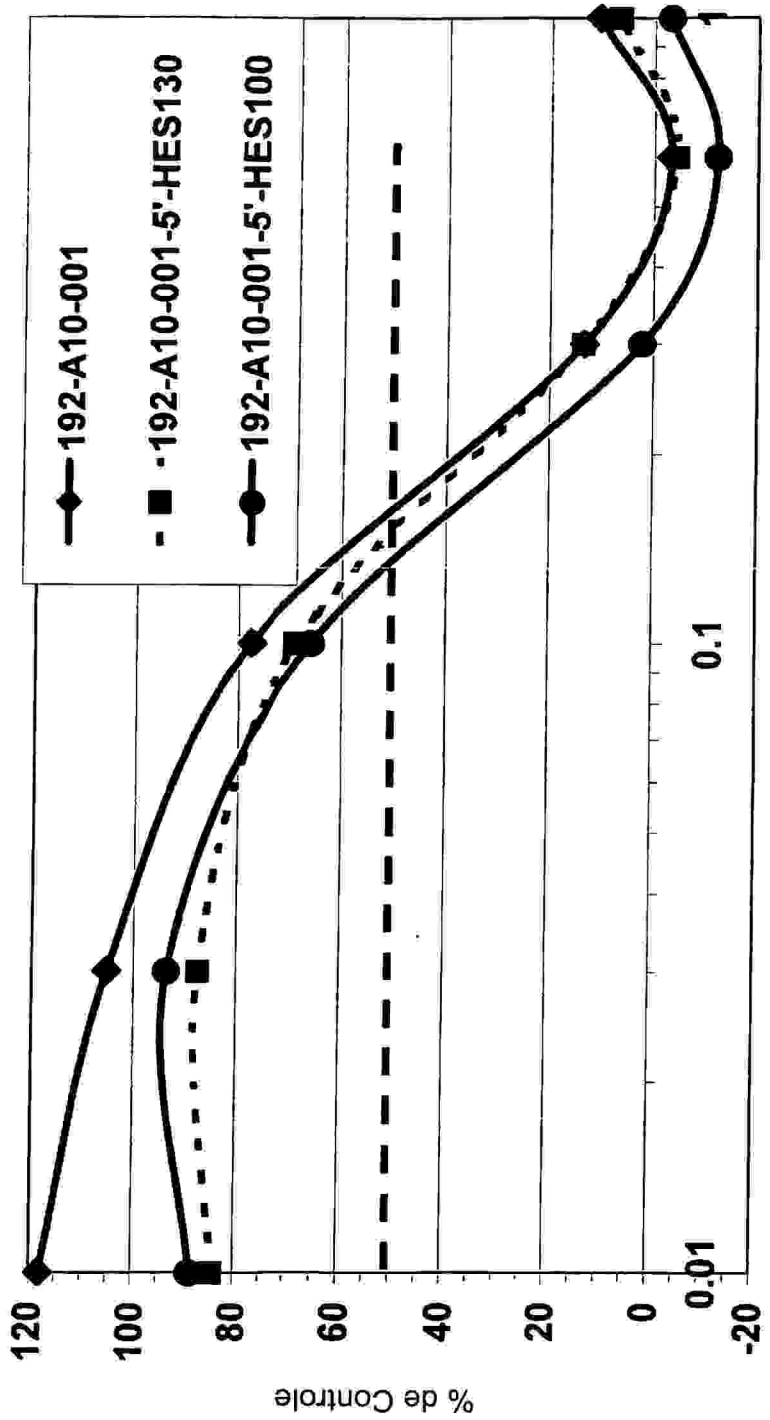

192-A10-001
192-A10-001-5'-HES130
192-A10-001-5'-HES100
% de Controle
120
100
80
60
40
20
0
-20
0.01
0.1
1
Spiegelmer [nM]

Fig. 25A

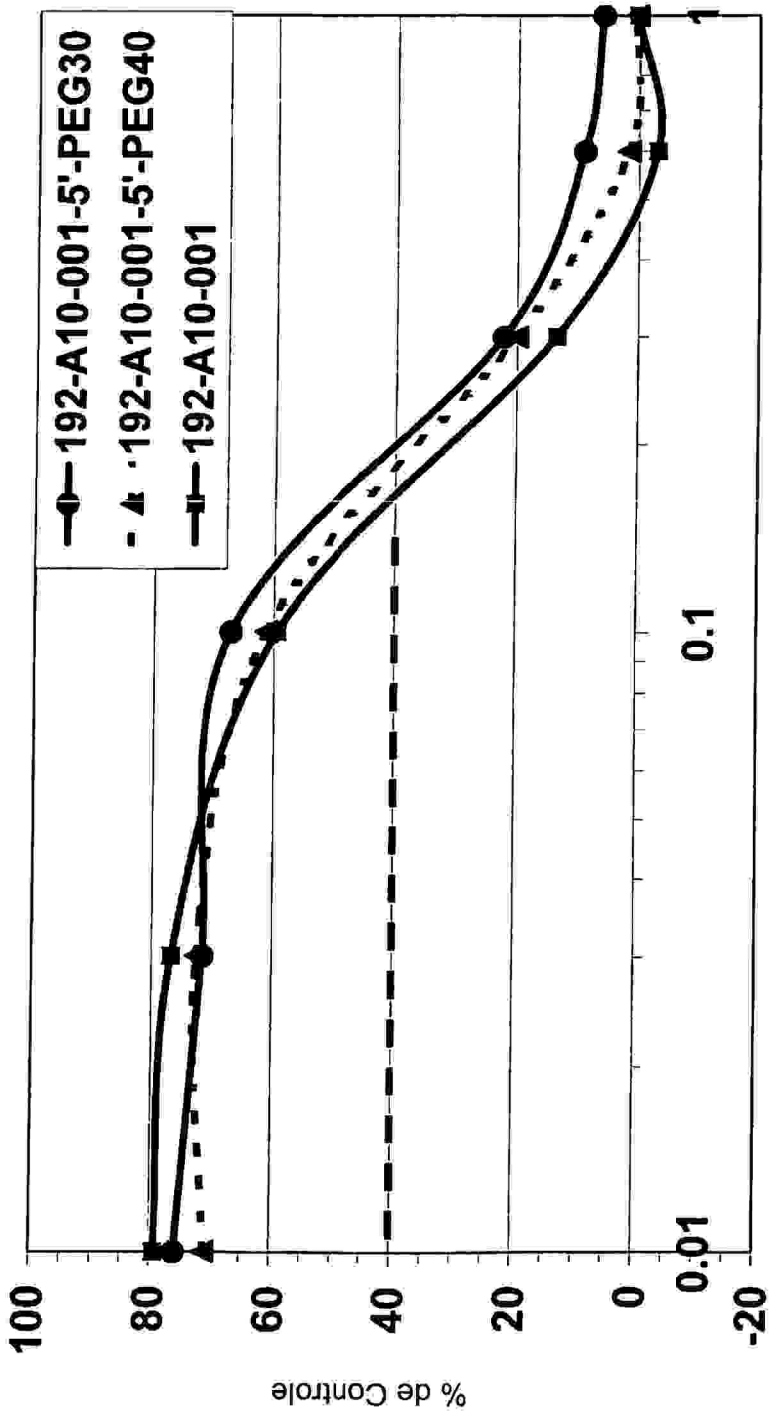

192-A10-001-5'-PEG30
192-A10-001-5'-PEG40
192-A10-001
% de Controle
100
80
60
40
20
0
-20
0.01
0.1
1
Spiegelmer [nM]

Fig. 25B

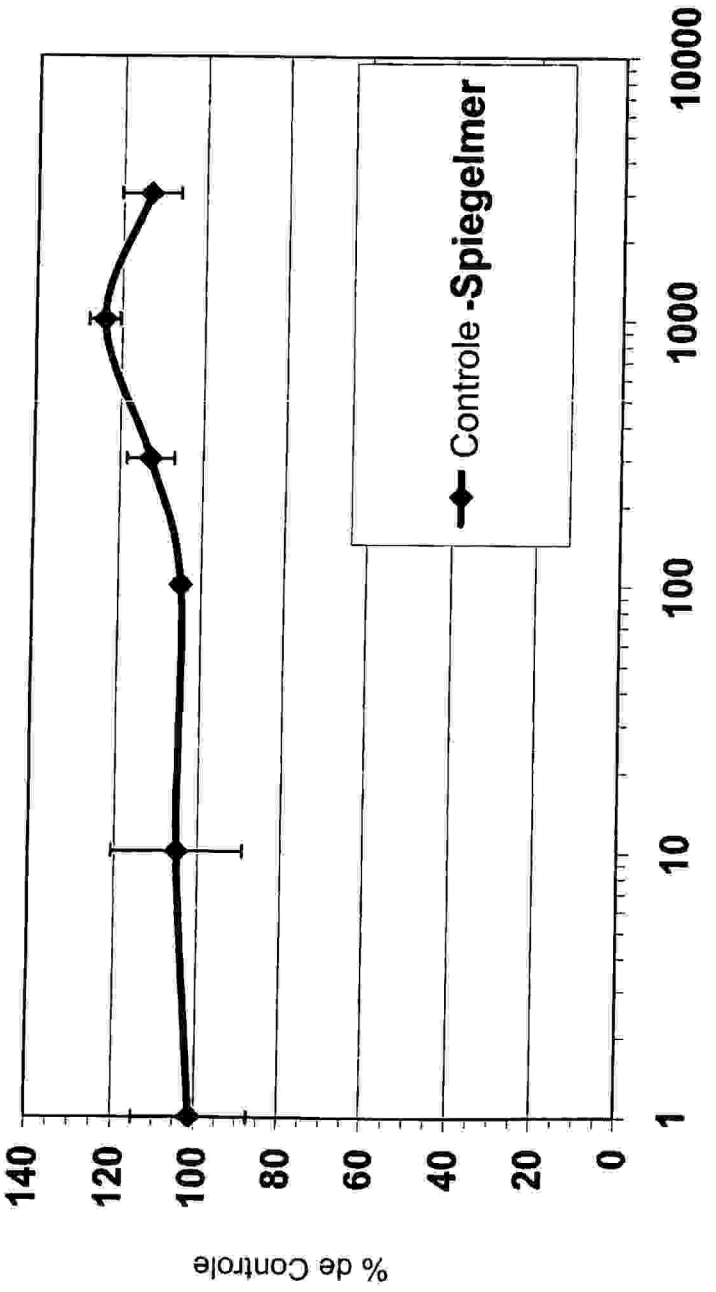

% de Controle
140
120
100
80
60
40
20
0
1
10
100
1000
10000
Controle Spiegelmer [nM]
Controle -Spiegelmer

Fig. 26

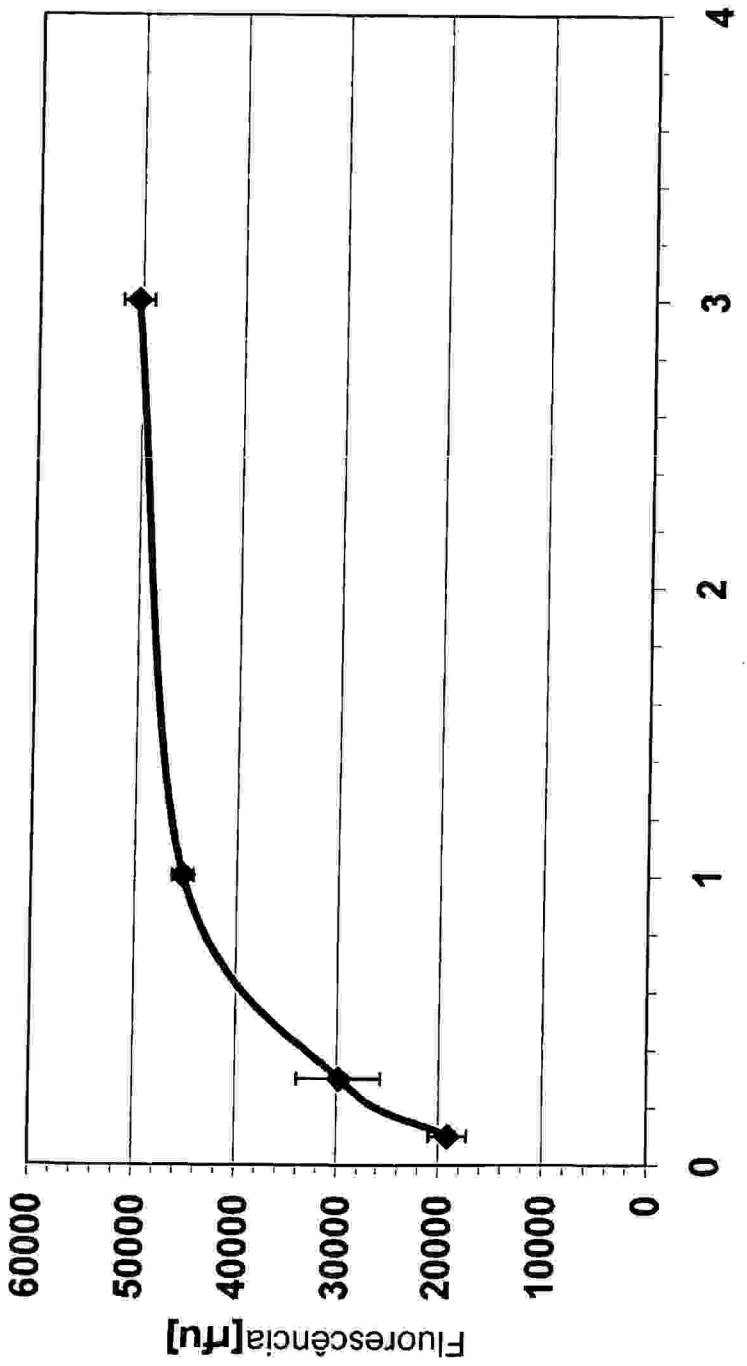

Fluorescência [rfu]
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
0
1
2
3
4
SDF-1 de murina [nM]

Fig. 27

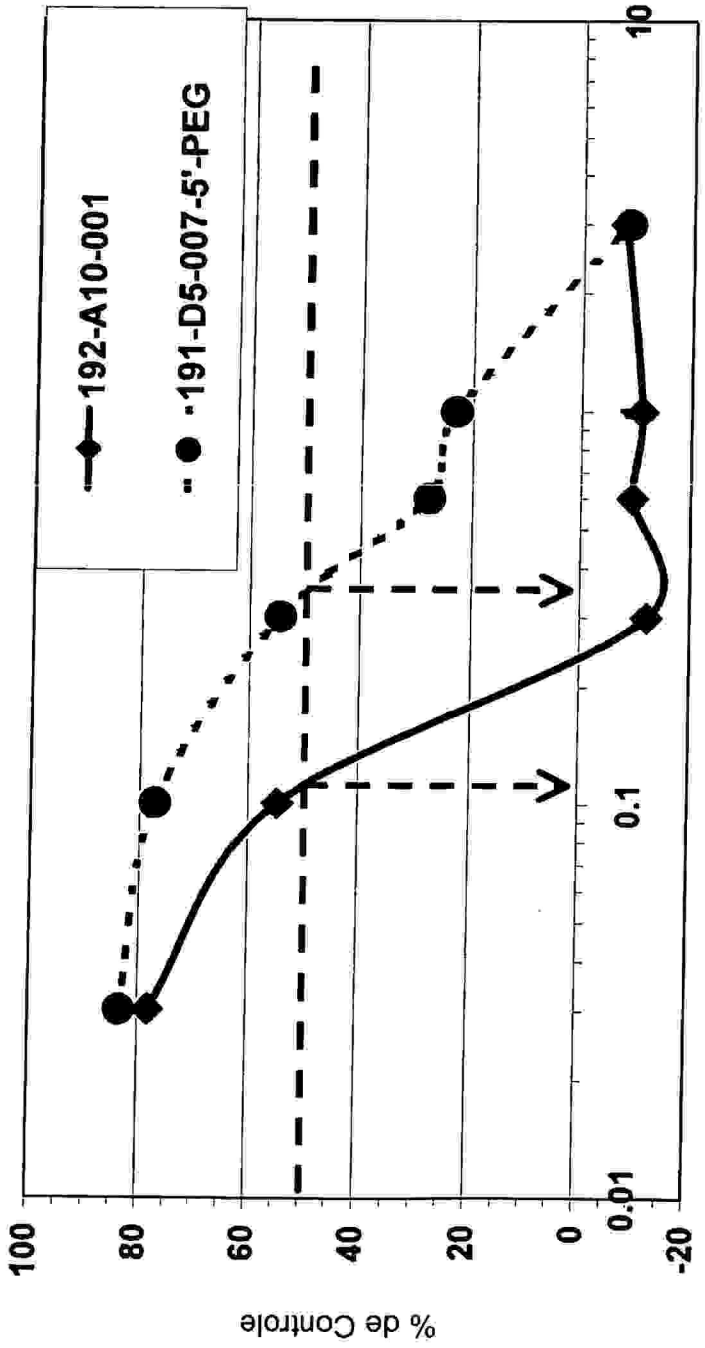

192-A10-001
191-D5-007-5'-PEG
% de Controle
100
80
60
40
20
0
-20
0.01
0.1
10
Spiegelmer [nM]

Fig. 28

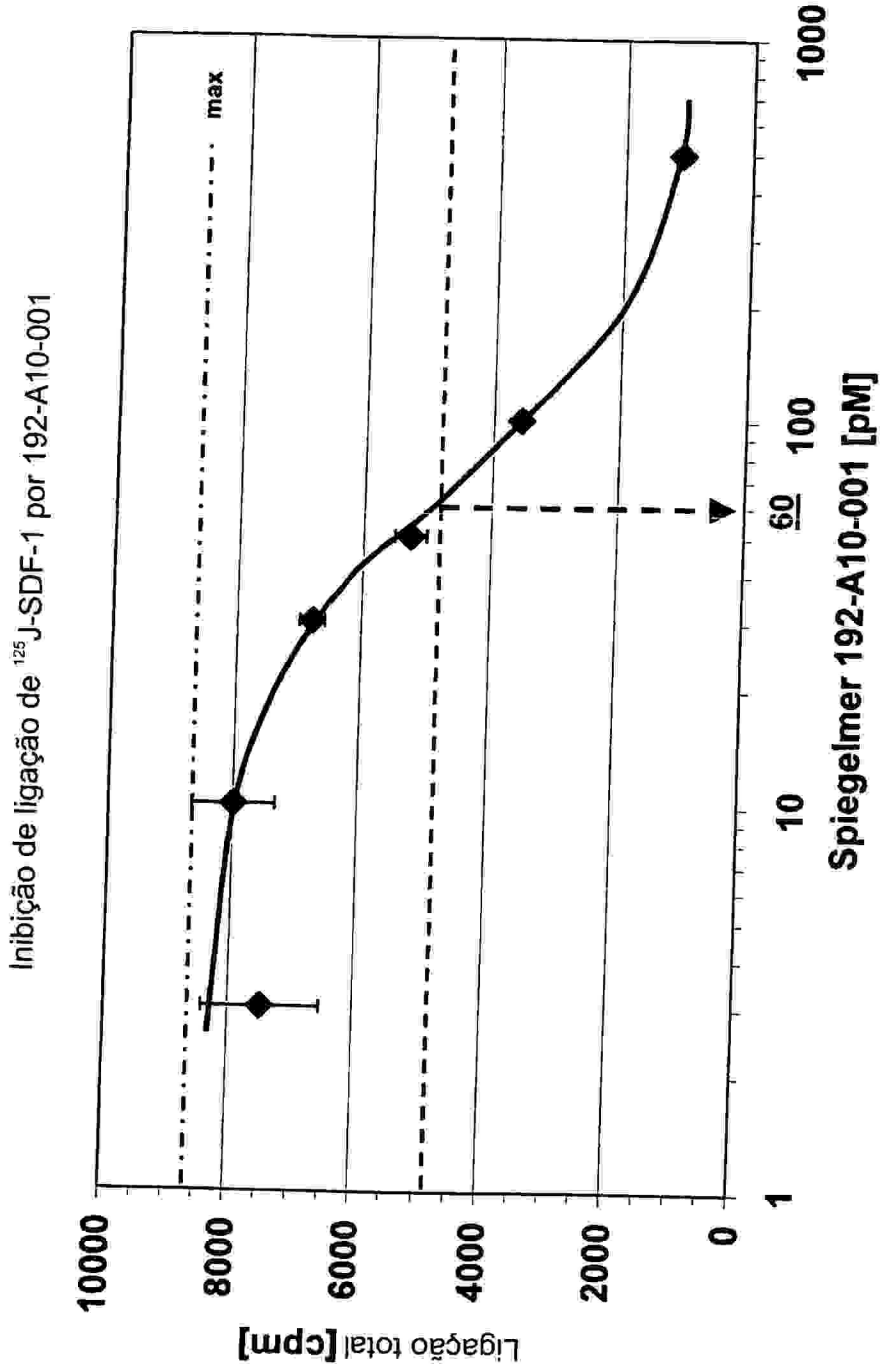

Inibição de ligação de 125J-SDF-1 por 192-A10-001
Ligação total [cpm]
10000
8000
6000
4000
2000
0
max
1
10
60
100
1000
Spiegelmer 192-A10-001 [pM]

Fig. 29

SDF-1 [nM]	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
192-A10-001 [nM]	0	0.1	0.3	1.0	3.0

Fig. 30

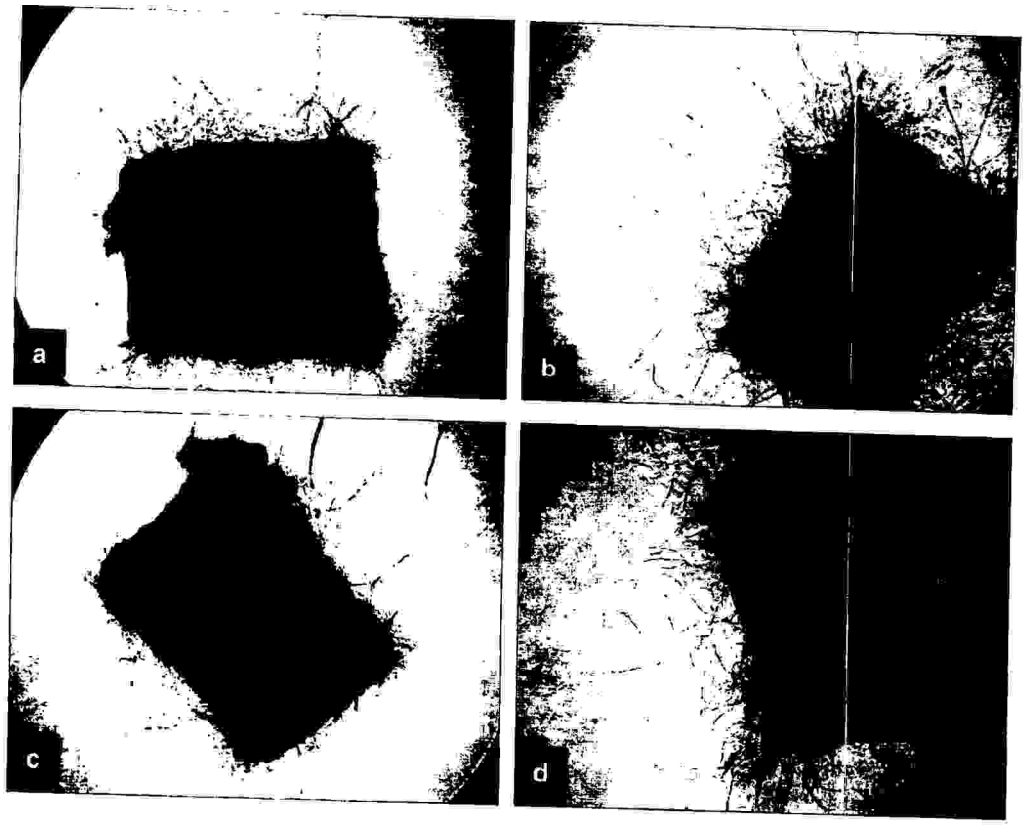


Fig. 31:

Germinação induzida por SDF-1 em um ensaio de anel aórtico. Anéis de aorta de rato foram embutidos em matriz de colágeno e incubados por 6 dias com SDF-1 com ou em Spiegelmers. a: controle; b: 10 nM SDF-1; c: 10 nM SDF-1 + 1 µM 193-G2-012-5'-PEG; d: 10 nM SDF-1 + 1 µM de Spiegelmer de Controle PEGilatado

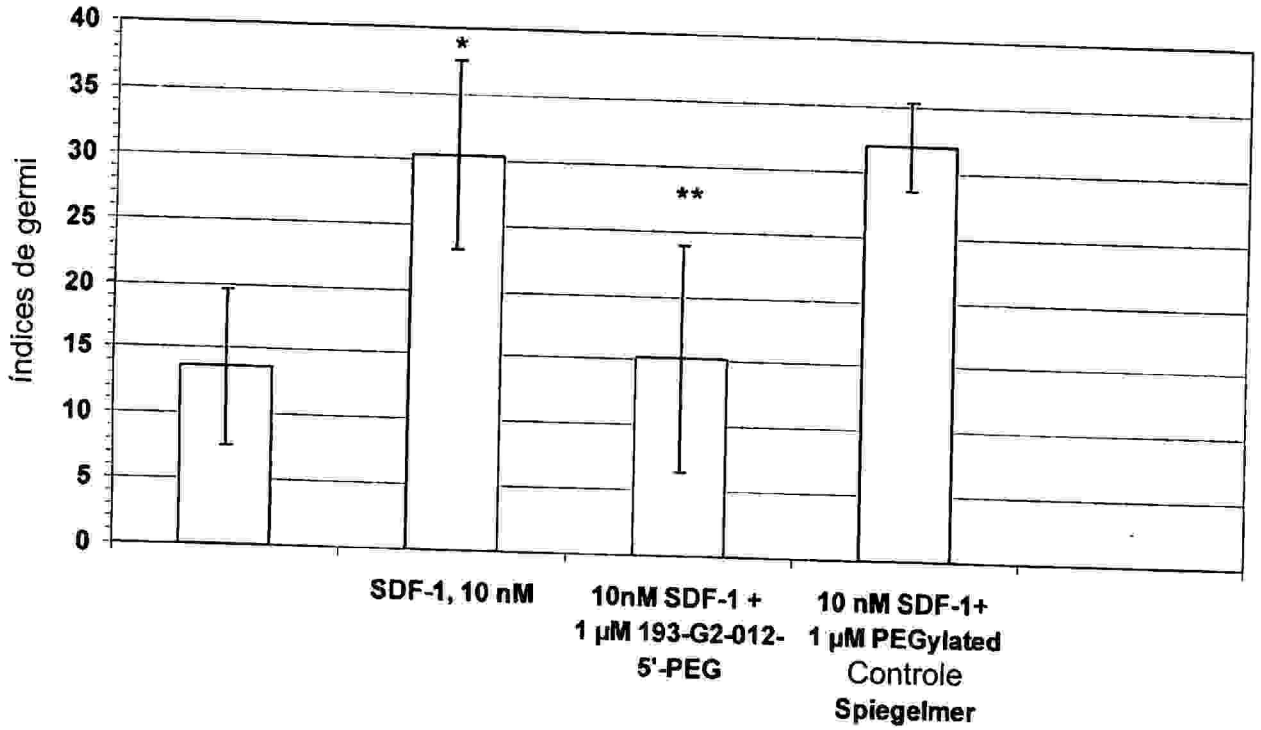


Fig. 32

Germinação induzida por SDF-1 e o bloqueio desta por Spiegelmers em um ensaio de germinação de anel aórtico. Anéis de aorta **de rato** foram embutidos em matriz de colágeno e incubados por 6 dias com SDF-1 com ou sem Spiegelmers. Os índices de germinação são mostrados como média +/- SD para 5 anéis por condição. *: o valor para SDF-1 é significantemente diferente do controle (teste de Mann-Whitney; p= 0.009) ; **:o valor para SDF-1 + 193-G2-012-5'-PEG é significantemente diferente daquela para SDF-1 (teste de Mann-Whitney; p= 0.028)

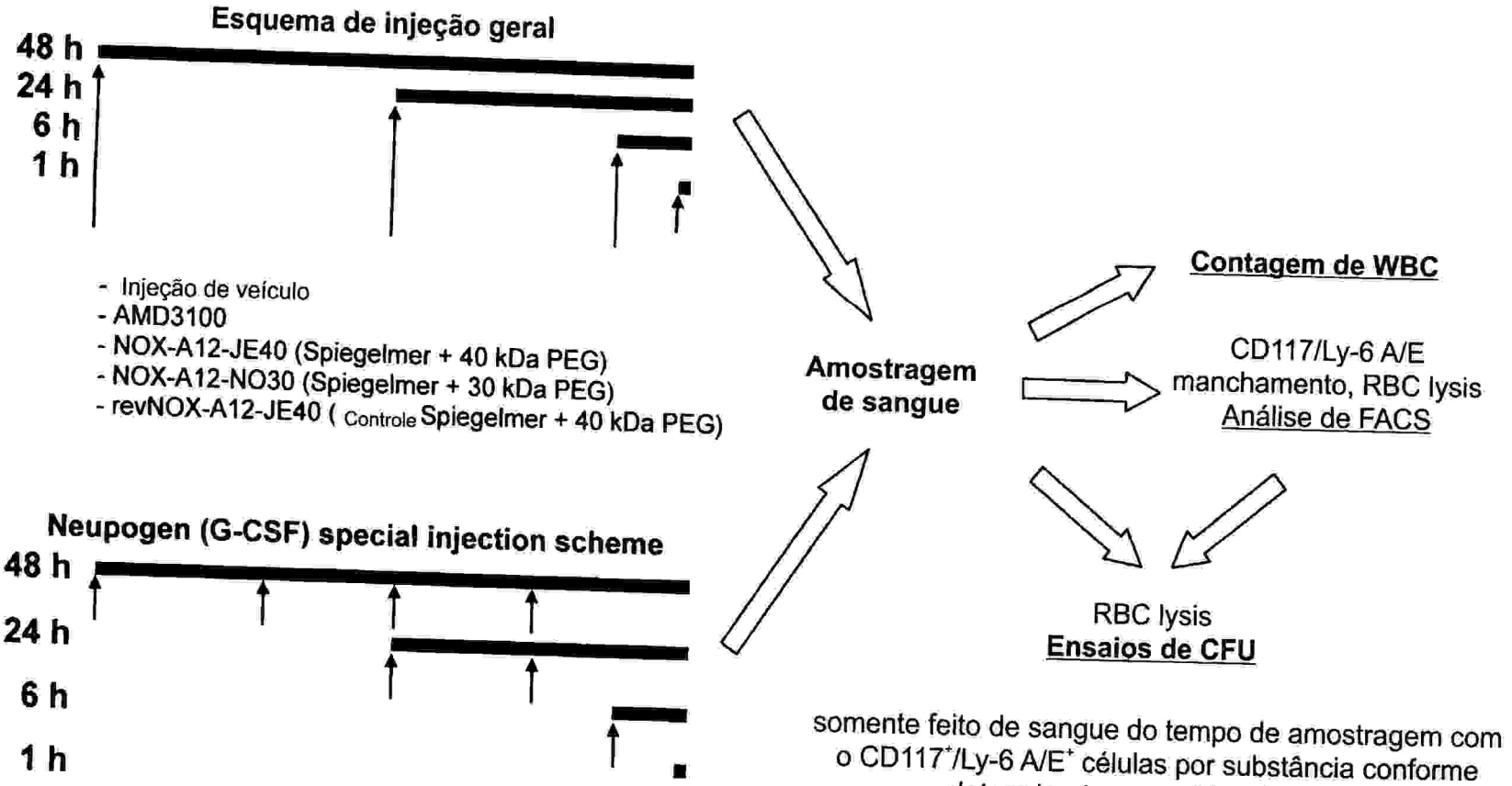

Esquema de injeção geral
48 h
24 h
6 h
1 h
- Injeção de veículo
- AMD3100
- NOX-A12-JE40 (Spiegelmer + 40 kDa PEG)
- NOX-A12-NO30 (Spiegelmer + 30 kDa PEG)
- revNOX-A12-JE40 (Controle Spiegelmer + 40 kDa PEG)
Amostragem de sangue
Contagem de WBC
CD117/Ly-6 A/E manchamento, RBC lysis
Análise de FACS
RBC lysis
Ensaios de CFU
Neupogen (G-CSF) special injection scheme
48 h
24 h
6 h
1 h
somente feito de sangue do tempo de amostragem com o CD117+/Ly-6 A/E+ células por substância conforme determinado por análise de FACS
Esquema de injeção especial (G-CSF) de Neupogem

Fig. 33

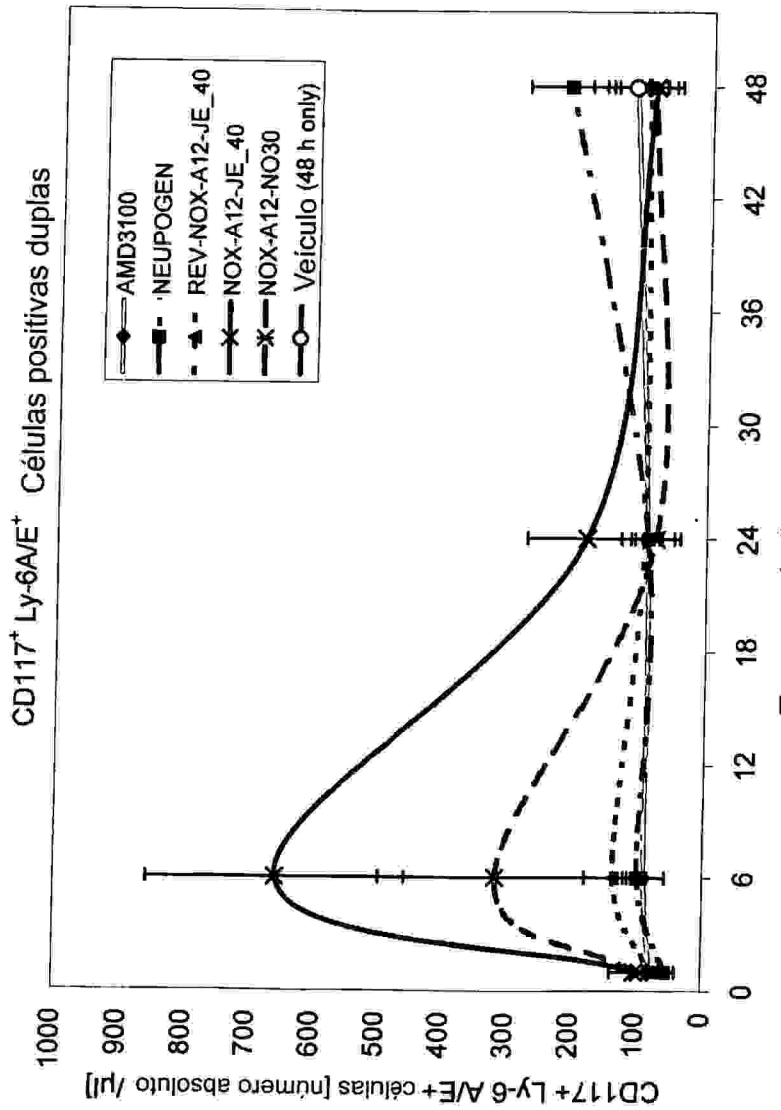

CD117+ Ly-6A/E+ Células positivas duplas
CD117+ Ly-6 A/E+ células [número absoluto /µl]
Tempo após IV injeção (horas)
AMD3100
NEUPOGEN
REV-NOX-A12-JE_40
NOX-A12-JE_40
NOX-A12-NO30
Veículo (48 h only)
0
100
200
300
400
500
600
700
800
900
1000
0
6
12
18
24
30
36
42
48

Fig. 34

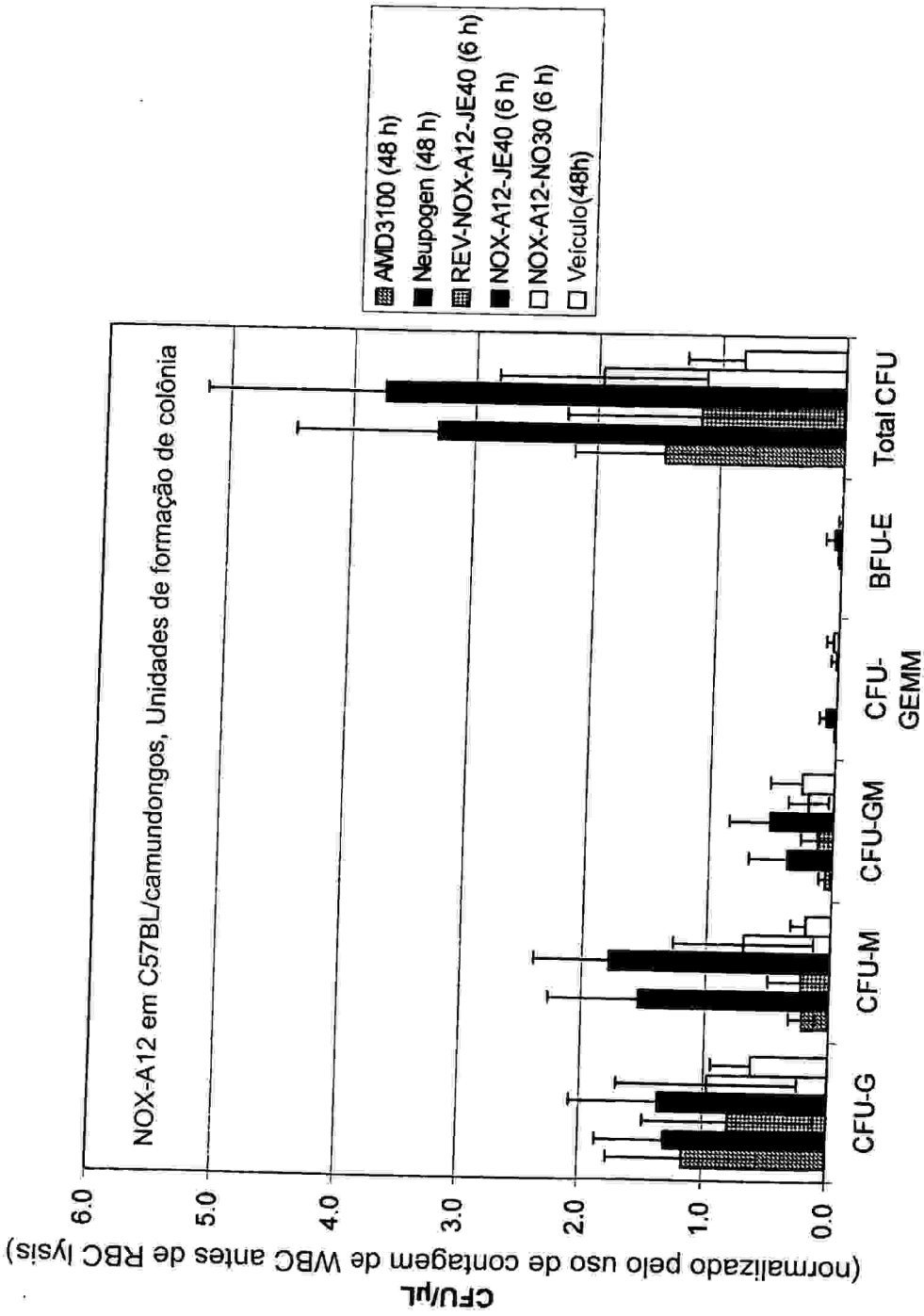
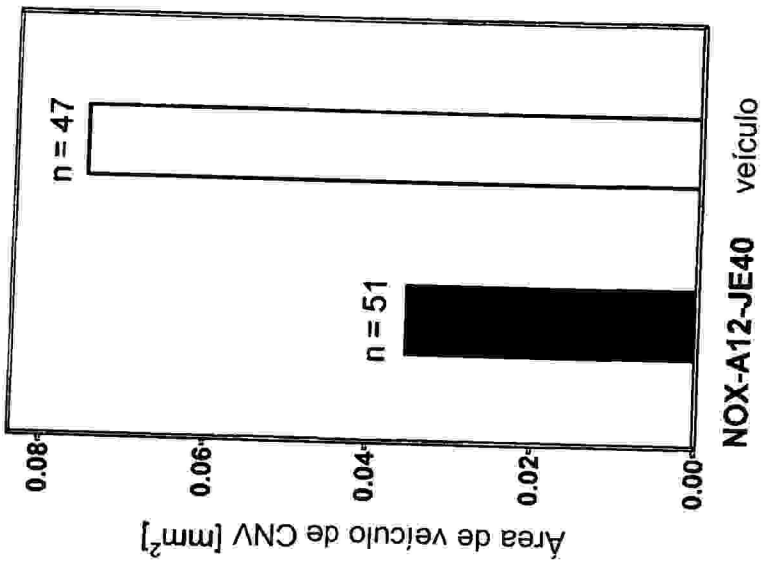
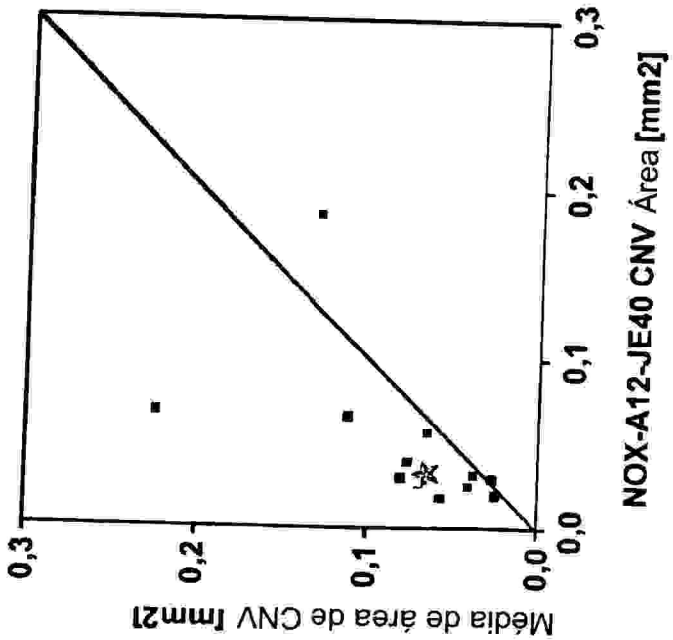

AMD3100 (48 h)
Neupogen (48 h)
REV-NOX-A12-JE40 (6 h)
NOX-A12-JE40 (6 h)
NOX-A12-NO30 (6 h)
Veículo(48h)
NOX-A12 em C57BL/camundongos, Unidades de formação de colônia
CFU/µL
(normalizado pelo uso de contagem de WBC antes de RBC lysis)
6.0
5.0
4.0
3.0
2.0
1.0
0.0
CFU-G
CFU-M
CFU-GM
CFU-GEMM
BFU-E
Total CFU

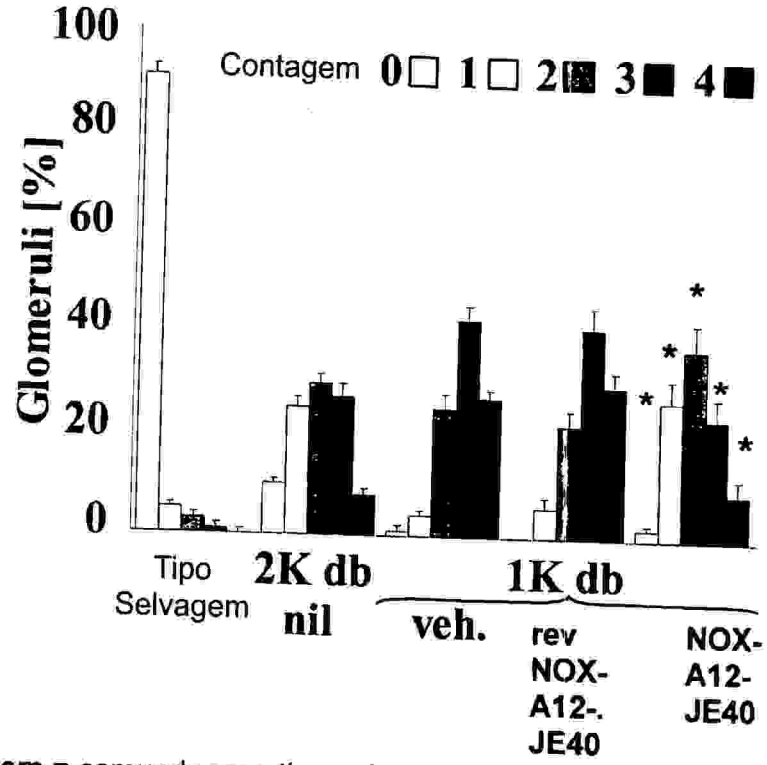
Fig. 35





n = número de queimaduras de laser avaliadas por grupo

Fig. 36



Tipo Selvagem = camundongos tipo selvagem sem qualquer tratamento.

2K db **nil** = camundongos diabéticos com dois rins sem qualquer tratamento

1K db = camundongos diabéticos após uninefrectomia (1 rim esquerdo)

veh. = veículo tratado (5 % de glicose para injeção)

Contagem 0-4 = Contagem de glomerulosclerose de 0 = saudável para 4 = altamente fibrótico.

Fig. 37

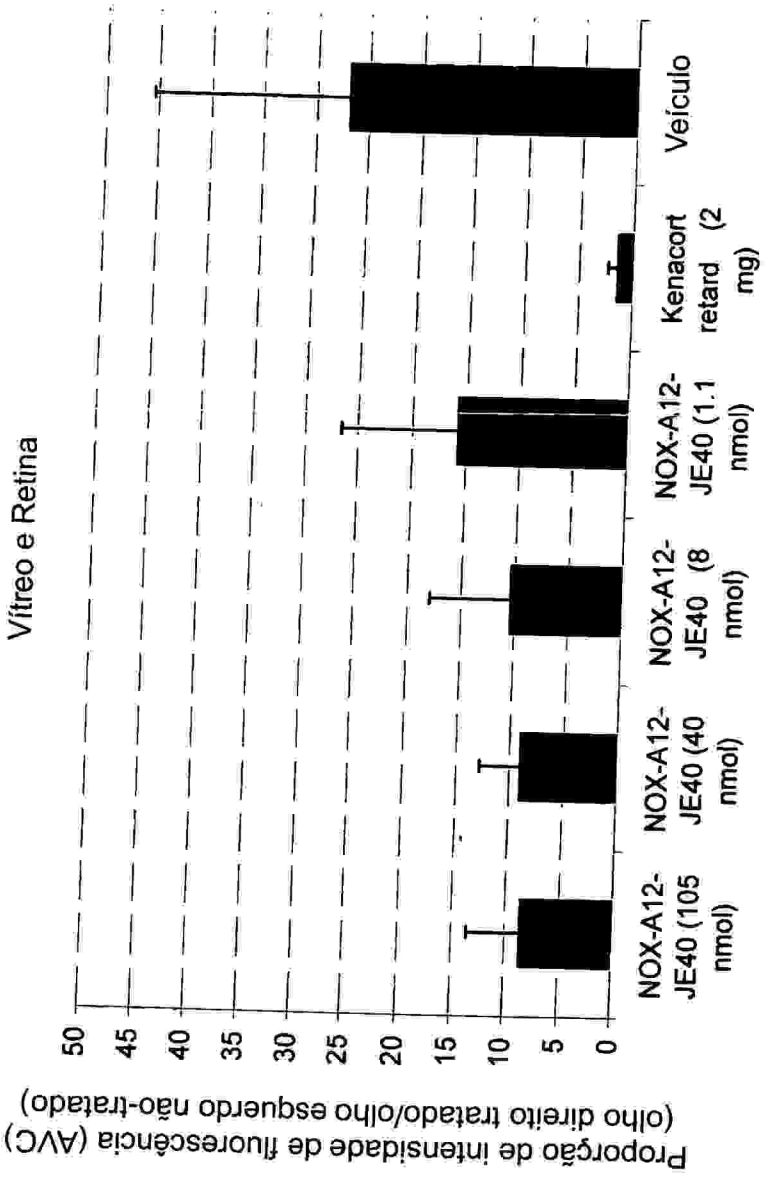
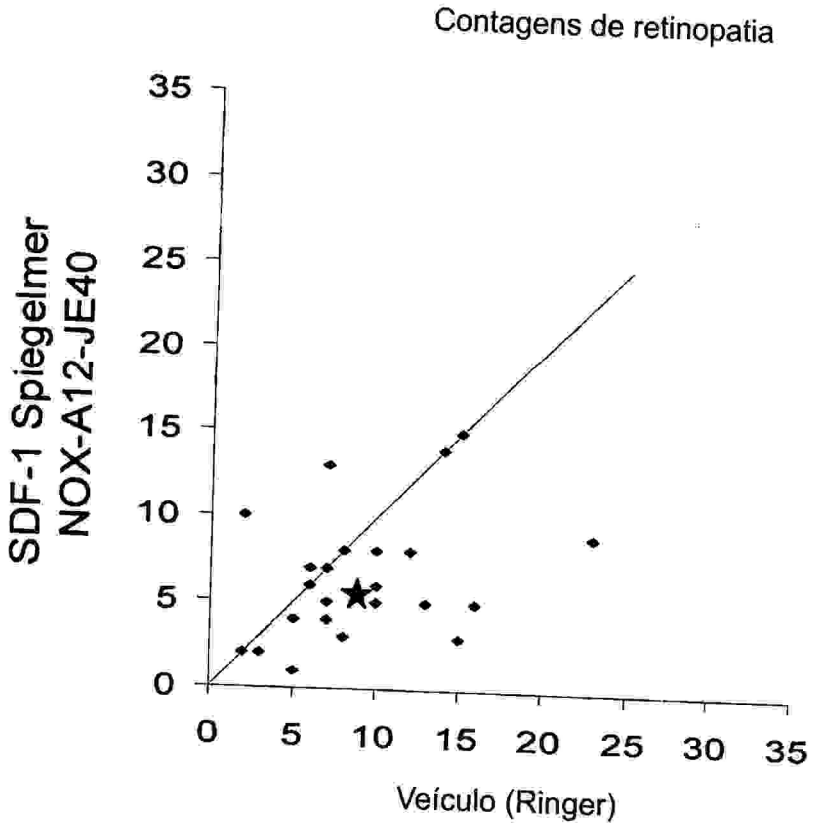

Vítreo e Retina
Proporção de intensidade de fluorescência (AVC)
(olho direito tratado/olho esquerdo não-tratado)
50
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
NOX-A12-JE40 (105 nmol)
NOX-A12-JE40 (40 nmol)
NOX-A12-JE40 (8 nmol)
NOX-A12-JE40 (1.1 nmol)
Kenacort retard (2 mg)
Veículo

Fig. 38



n= 24
p= 0,009

A contagem de retinopatia média é representada como uma estrela

Fig. 39

Estatísticas: Teste de Ranque de Wilcoxon / valores p

	Fluoresceína (n=24)	Isolectin (n=15)
Grupos (n)	0.210	0.057
Área absoluta do grupo	0.210	0.501
Área relative do grupo	0.501	0.365
Tufos (n)	0.008	0.0215
Zona absoluta avascular	0.3531	0.2524
Zona relative avascular	0.398	0.359
Contagem de retinopatia	0.009	

Fig. 40

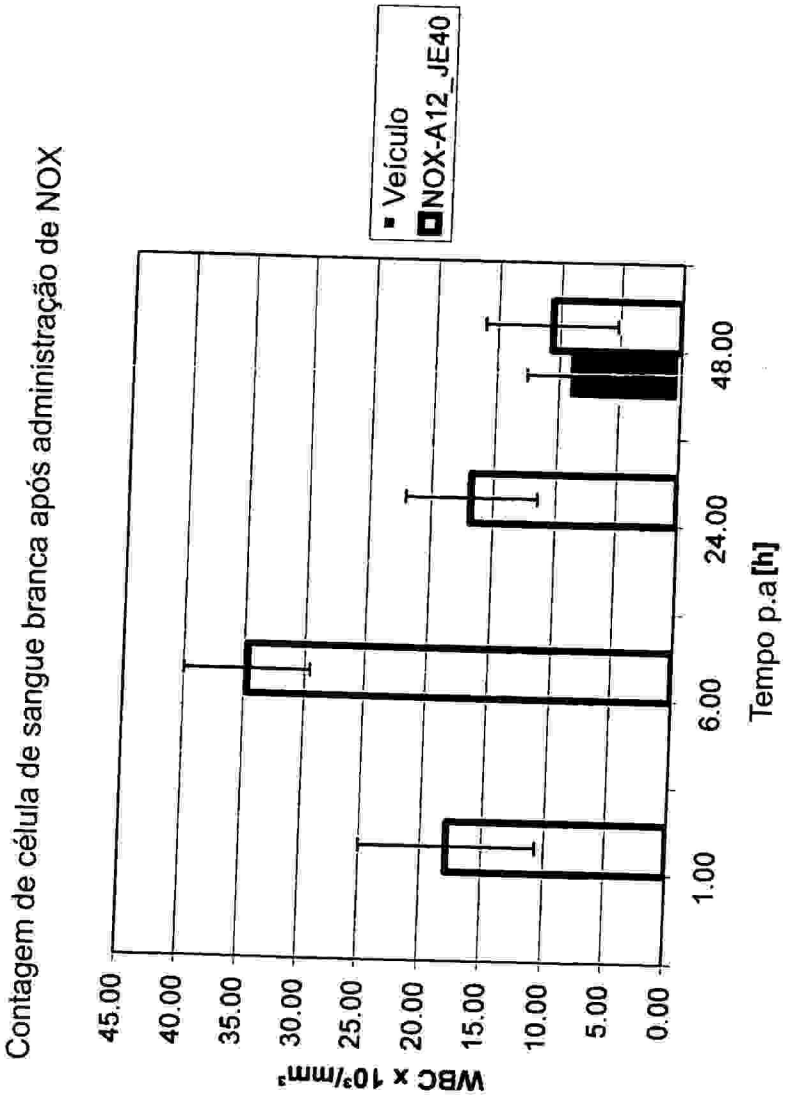

Contagem de célula de sangue branca após administração de NOX
Veículo
NOX-A12_JE40
WBC x 10³/mm³
45.00
40.00
35.00
30.00
25.00
20.00
15.00
10.00
5.00
0.00
1.00
6.00
24.00
48.00
Tempo p.a [h]

Fig. 41

Indicações de HSCT alogenêica na Europa 1999-2000

	N° de pacientes			
	Total 1990-2000	%	Total 2000	%
Leucemia	33 509	75.9	4653	72.7
Leucemia mielóide aguda	10 990	24.9	1627	25.4
Leucemia linfocítica aguda	8 871	20.1	1135	17.7
Leucemia mielóide crônica	10 559	23.9	1315	20.5
Síndromes mielodisplástica	2 680	6.1	454	7.1
Leucemia linfocítica crônica	409	0.9	122	1.9
Distúrbios linfoproliferativos	3 930	8.9	820	12.8
Mieloma múltiplo	1 470	3.3	295	4.6
Doença de Hodgkin	320	0.7	68	1.1
Linfoma de Não-Hodgkin	2 140	4.8	457	7.1
Tumores sólidos	272	0.6	104	1.6
Neuroblastoma	30	0.1	1	0.0
Glioma	2	0.0	1	0.0
Sarcoma de tecido macio	13	0.0	5	0.1
Tumores germinais	10	0.0	3	0.0
Câncer de seio	57	0.1	16	0.2
Sarcoma de Ewing	28	0.1	4	0.1
Câncer de pulmão	1	0.0	0	0.0
Câncer de ovário	11	0.0	7	0.1
Outros tumores sólidos	120	0.3	67	1.0
Distúrbios não-malignos	5 695	12.9	700	10.9
Anemia aplástica + Fanconi	2 483	5.6	287	4.5
Talassemia	1 349	3.1	147	2.3
Deficiências imunes combinadas	724	1.6	103	1.6
Erros de inbom	1 112	2.5	153	2.4
Doenças autoimunes	27	0.1	10	0.2
Outras	759	1.7	127	2.0
Total	44 165		6404	

Fig. 42

Indicações de HSCT alogenêica na Europa 1999-2000

	N° de pacientes			
	Total 1990-2000	%	Total 2000	%
Leucemia	15 052	17.0	1 764	13.9
Leucemia mielóide aguda	8 129	9.2	1 047	8.2
Leucemia linfocítica aguda	3 765	4.2	302	2.4
Leucemia mielóide crônica	1 957	2.2	148	1.2
Síndromes mielodisplástica	297	0.3	50	0.4
Leucemia linfocítica crônica	894	1.0	217	1.7
Distúrbios linfoproliferativos	48 917	55.1	8 498	66.7
Mieloma múltiplo	16 206	18.3	3 388	26.6
Doença de Hodgkin	9 078	10.2	1 226	9.6
Linfoma de Não-Hodgkin	23 633	26.6	3 884	30.5
Tumores sólidos	24 016	27.0	2 286	18.0
Neuroblastoma	1 912	2.2	262	2.1
Glioma	544	0.6	73	0.6
Sarcoma de tecido macio	1 013	1.1	144	1.1
Tumores germinais	2 658	3.0	304	2.4
Câncer de seio	12 598	14.2	781	6.1
Sarcoma de Ewing	1 401	1.6	244	1.9
Câncer de pulmão	318	0.4	62	0.5
Câncer de ovário	628	0.7	100	0.8
Outros tumores sólidos	2 944	3.3	316	2.5
Distúrbios não-malignos	321	0.4	100	0.8
Anemia aplástica + Fanconi	7	0.0	1	0.0
Talassemia	0	0.0	0	0.0
Deficiências imunes combinadas	10	0.0	2	0.0
Erros de inbom	4	0.0	0	0.0
Doenças autoimunes	300	0.3	97	0.8
Outras	492	0.6	84	0.7
Total	88 798		12 732	

Fig. 43