

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 992 308**

51 Int. Cl.:

C12N 15/115	(2010.01) A61P 27/02	(2006.01)
A61K 9/08	(2006.01) A61P 29/00	(2006.01)
A61K 48/00	(2006.01)	
A61K 31/7105	(2006.01)	
A61K 47/26	(2006.01)	
A61P 9/00	(2006.01)	
A61P 19/00	(2006.01)	
A61P 19/02	(2006.01)	
A61P 19/10	(2006.01)	
A61P 25/04	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.06.2019** **PCT/JP2019/025766**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **02.01.2020** **WO20004607**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.06.2019** **E 19825285 (0)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.09.2024** **EP 3815715**

54 Título: **Preparación de aptámero**

30 Prioridad:

29.06.2018 JP 2018124390

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.12.2024

73 Titular/es:

RIBOMIC INC. (100.0%)
16-13, Shirokanedai 3-chome Minato-ku
Tokyo 108-0071, JP

72 Inventor/es:

NAKAMURA, YOSHIKAZU;
AKITA, KAZUMASA y
ALI, YUSUF

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 992 308 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Preparación de aptámero

Campo técnico

- 5 La presente invención se refiere a una preparación de aptámero, particularmente una preparación de aptámero que contiene un aptámero para un factor de crecimiento de fibroblastos básico (FGF2) como ingrediente activo.

Antecedentes de la técnica

- 10 En los últimos años, las aplicaciones de los aptámeros de ARN a medicamentos, reactivos de diagnóstico y reactivos de ensayo han llamado la atención, y algunos aptámeros de ARN ya se encuentran en la etapa de estudio clínico o uso práctico. El primer fármaco aptámero de ARN del mundo, Macugen (marca comercial registrada) (nombre general: pegaptanib sódico), fue aprobado como fármaco terapéutico para la degeneración macular relacionada con la edad en diciembre de 2004 en EE. UU. y en julio de 2008 en Japón. Macugen (marca comercial registrada) contiene un aptámero contra VEGF como cuerpo vivo. El aptámero está compuesto por un oligonucleótido sintético que consiste en 28 moléculas de ácido nucleico y un derivado de polietilenglicol (PEG) está unido al extremo 5' del mismo.

- 15 La forma de dosificación de Macugen (marca comercial registrada) es una inyección con jeringa precargada y se inyecta en el cuerpo vítreo. Es una inyección acuosa transparente que es de incolora a ligeramente coloreada y contiene hidrógenofosfato de sodio, dihidrógenofosfato de sodio, un agente isotónico y un ajustador de pH. Se ha mostrado que esta formulación de preparación es estable durante 6 meses en un ensayo acelerado a 25 ± 2 °C y durante 36 meses en un ensayo de almacenamiento a largo plazo a 5 ± 3 °C (documento no de patente 1).

- 20 Por otra parte, en el momento de la presentación de la presente solicitud, no existía ningún producto farmacéutico aparte de Macugen (marca comercial registrada) que contuviera un aptámero como ingrediente activo, y no se sabe en absoluto qué formulación de preparación es apropiada para preparaciones de aptámeros.

- 25 El Solicitante está desarrollando un producto farmacéutico que contiene un aptámero para FGF2 como ingrediente activo y aplicable a la degeneración macular relacionada con la edad, la acondroplasia y el dolor causado por el cáncer (documentos de patente 1 y 2). En el proceso de desarrollo de una preparación de aptámero de FGF2, los presentes inventores obtuvieron resultados de que una formulación de preparación considerada casi igual a Macugen (marca comercial registrada) y una formulación de preparación que contiene solución salina tamponada con fosfato (PBS) como medio no puede mantener la actividad del aptámero de FGF2. El documento de patente 3 divulga un aptámero para FGF2 y el uso del mismo. El documento de patente 4 divulga un método de almacenamiento a largo plazo de perlas acopladas a sustrato. El documento que no es de patente 2 informa sobre los aptámeros como posibles fármacos de peso molecular medio.

Lista de documentos

Documentos de patente

documento de patente 1: WO 2011/099576

documento de patente 2: WO 2015/147017

- 35 documento de patente 3: EP 3 124 611 A1

documento de patente 4: WO 2009/118108 A1

[documento que no es de patente]

- 40 documento que no es de patente 1: Formulario de entrevista sobre productos farmacéuticos, agente terapéutico para la degeneración macular relacionada con la edad Macugen (marca comercial registrada), kit de inyección intravítrea de 0,3 mg, marzo de 2015 (5ª edición revisada)

documento que no es de patente 2: Nakamura, Y. (Biochemie 145(2018) 22-23)

Sumario de la invención

Problema técnico

- 45 Por lo tanto, la presente invención tiene como objetivo proporcionar una formulación de preparación capaz de mantener de manera estable la actividad de un aptámero, particularmente un aptámero para FGF2, durante un largo plazo, proporcionando así una preparación farmacéutica que contiene un aptámero, particularmente un aptámero de FGF2, como ingrediente activo.

Solución al problema

Los presentes inventores han llevado a cabo estudios intensivos en un intento de lograr el propósito mencionado anteriormente y encontraron condiciones de preparación óptimas para el aptámero de FGF2, lo que dio como resultado la compleción de la presente invención.

- 5 La invención se expone en las reivindicaciones adjuntas.

Efectos ventajosos de la invención

Según la presente invención, se puede proporcionar una preparación de aptámero fácilmente manipulable porque un aptámero para FGF2 o una sal del mismo que es el ingrediente activo se puede almacenar de manera estable durante un largo plazo en forma de un líquido acuoso.

10 Descripción de realizaciones

La presente invención proporciona una preparación farmacéutica que contiene un aptámero para FGF2 o una sal del mismo como ingrediente activo, en donde el aptámero o una sal del mismo se mantiene estable durante un largo plazo (en lo sucesivo también se denominará "la preparación de aptámero de la presente invención"). Como se usa en la presente memoria, "estable durante un largo plazo" significa que la proporción de un aptámero monómero después del almacenamiento de la preparación contenida en una botella de vidrio a 4 °C durante 3 meses no es inferior al 70 %. La proporción del aptámero monómero es un valor obtenido separando y detectando monómeros y multímeros mediante cromatografía de exclusión por tamaño en las siguientes condiciones, y calculando (área del pico de monómeros) / (área total del pico de monómeros y multímeros) x100 (%).

aparato: ACQUITY UPLC H-Class Bio fabricado por Waters

- 20 detector: detector TUV fabricado por Waters

columna: columna ACQUITY UPLC BEH200 SEC fabricada por Waters

concentración de la muestra: 0,2 mg/ml

volumen de inyección: 5 µL

eluyente: acetonitrilo al 10 %/PBS

- 25 caudal: 0,3 ml/min

temperatura de la columna: 25 °C

La preparación de aptámero de la presente invención contiene un aptámero para FGF2 o una sal del mismo como el ingrediente activo, y un osmorregulador no electrolítico.

- 30 Un aptámero se refiere a una molécula de ácido nucleico que tiene actividad de unión para una molécula diana particular. El aptámero puede inhibir la actividad de una molécula diana particular uniéndose a la molécula diana. El aptámero que será el ingrediente activo de la preparación de aptámero de la presente invención es un aptámero que tiene actividad de unión a FGF2. En una realización preferida, el aptámero es un aptámero que puede unirse a FGF2 e inhibir la unión entre FGF2 y el receptor de FGF. Es decir, el aptámero tiene actividad inhibidora contra FGF2.

- 35 El aptámero usado en la presente invención es un aptámero que se une a FGF2, y más preferiblemente un aptámero que puede unirse a FGF2 e inhibir la unión entre FGF2 y el receptor de FGF. Si el aptámero usado en la presente invención inhibe o no la unión entre FGF2 y el receptor de FGF se puede evaluar, por ejemplo, mediante un ensayo que usa el método de resonancia de plasmón superficial tal como el Ejemplo 1 y similares.

- 40 Si bien el aptámero para FGF2 no está particularmente limitado, por ejemplo, el aptámero descrito en WO 2015/147017, específicamente, un aptámero que contiene una secuencia de nucleótidos representada por la siguiente fórmula (1) (en donde uracilo es opcionalmente timina):

$N^1GGAN^2ACUAGGGCN^3UUAAN^4GUN^5ACCAGUGUN^6(1)$

y es el siguiente (a) o (b):

(a) un aptámero en donde, en los nucleótidos contenidos en el aptámero,

(i) la posición 2' de la ribosa de cada nucleótido de pirimidina es un átomo de flúor,

- 45 (ii) la posición 2' de la ribosa de cada nucleótido de purina es un grupo hidroxilo;

(b) un aptámero en donde, en los nucleótidos contenidos en el aptámero,

(i) la posición 2' de la ribosa de cada nucleótido de pirimidina está independientemente no sustituida o sustituida con un átomo o grupo seleccionado del grupo que consiste en un átomo de hidrógeno, un grupo metoxi y un átomo de flúor,

- 5 (ii) la posición 2' de la ribosa de cada nucleótido de purina está independientemente no sustituida o sustituida con un átomo o grupo seleccionado del grupo que consiste en un átomo de hidrógeno, un grupo metoxi y un átomo de flúor.

En la fórmula (1) mencionada anteriormente, N¹ y N⁶ son cada uno independientemente cualquiera de 0 a varias bases, y N², N³, N⁴ y N⁵ son independientemente una base cualquiera. En la presente memoria descriptiva, "base" significa cualquiera de adenina (A), guanina (G), citosina (C), uracilo (U) o timina (T) que constituyen un ácido nucleico.

- 10 Si bien el número de bases de N¹ no está particularmente limitado siempre que un aptámero que contenga una secuencia de nucleótidos representada por la fórmula (1) se una a FGF2, puede ser, por ejemplo, 0 - aproximadamente 10, 0-9, 0-8, 0-7, 0-6, 0-5, 0-4, 0-3, 0-2 y similares, preferiblemente 0-2.

De manera similar, si bien el número de base de N⁶ no está particularmente limitado, puede ser, por ejemplo, 0 - aproximadamente 10, 0-9, 0-8, 0-7, 0-6, 0-5, 0-4, 0-3 y similares, preferiblemente 0-10, 3-9 o 5-8.

En una realización preferida, en la fórmula (1) mencionada anteriormente,

- 15 N¹ es G, GG, AG, C o hueco,

N² es A o U,

N³ es G, C o A,

N⁴ es G, C o U,

N⁵ es G o U, y

- 20 N⁶ es UUCN⁶¹ o AGUCN⁶² en donde N⁶¹ y N⁶² son cada uno independientemente cualquiera de 0 a varias bases. Aquí, N¹ es un "hueco" significa que N¹ está ausente en la fórmula (1), es decir, N¹ es 0 bases.

Si bien el número de bases de N⁶¹ no está particularmente limitado, puede ser, por ejemplo, 0 - aproximadamente 10, 0-7, 0-6, 0-5, 0-4 y similares, preferiblemente 0-5, 1-5, o 2-4.

- 25 Si bien el número de bases de N⁶² tampoco está particularmente limitado, puede ser, por ejemplo, 0 - aproximadamente 10, 0-7, 0-6, 0-5, 0-4, 0-3 y similares, preferiblemente 0-5, 0-4 o 0-3.

En otra realización preferida, en la fórmula (1) mencionada anteriormente,

N¹ es G, GG, AG o hueco,

N² es A o U,

N³ es G o A,

- 30 N⁴ es C o U,

N⁵ es G o U

N⁶ es UUCN⁶¹ o AGUCN⁶² en donde N⁶¹ y N⁶² son como se definen anteriormente.

En una realización preferida, el aptámero utilizado en la presente invención contiene una secuencia de nucleótidos representada por la siguiente fórmula (2) o (3):

GGGAAACUAGGGGCGUUAACGUGACCAGUGUUCN⁶¹ (2)

- 35 N¹GGAUACUAGGGCAUUAAGUGUACCAGUSUAGUCN⁶² (3)

en donde N¹, N⁶¹ y N⁶² son como se definen anteriormente, más preferiblemente, una secuencia de nucleótidos representada por la fórmula (3).

En una realización preferida, el aptámero utilizado en la presente invención contiene una secuencia de nucleótidos mostrada por cualquiera de las SEQ ID NO: 1-12. Las secuencias de nucleótidos que se muestran en las SEQ ID NO: 1-12 se dan a continuación (en donde uracilo es opcionalmente timina) (en adelante, A, G, C y U muestran que la base del nucleótido es adenina, guanina, citosina o uracilo, respectivamente):

- 40

SEQ ID NO: 1:

GGGAUACUAGGGCAUUAUGGUUACCAGUGUAGUCUCCA

SEQ ID NO: 2:

GGGAAACUAGGGCGUUAACGUGACCAGUGUUUCUCC#

SEQ ID NO: 3:

GGGAUACUAGGGCAUUAUGGUUACCAGUGUAGUCCC

SEQ ID NO: 4:

GGGAUACUAGGGCAUUAUGGUUACCAGUGUAGUCC

SEQ ID NO: 5:

GGGGAUACUAGGGCAUUAUGGUUACCAGUGUAGUCCC

SEQ ID NO: 6:

AGGGAUACUAGGGCAUUAUGGUUACCAGUGUAGUCCC

SEQ ID NO: 7:

GGGAAACUAGGGCGUUAACGUGACCAGUGUUUCCC

SEQ ID NO: 8:

CGGAUACUAGGGCAUUAUGGUUACCAGUGUAGUCCG

SEQ ID NO: 9:

CCGAUACUAGGGCAUUAUGGUUACCAGUGUAGUCCG

SEQ ID NO: 10:

GGGAUACUAGGGCGUUAACGUGUACCAGUGUAGUCCC

SEQ ID NO: 11:

GGGAUACUAGGGCCUUAAGGUUACCAGUGUAGUCCC

SEQ ID NO: 12:

GGGAUACUAGGGCAUUAUGGUUACCAGUGUAGUCCC

En una realización preferida, el aptámero utilizado en la presente invención contiene una secuencia de nucleótidos que se muestra en la SEQ ID NO: 1, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10 o 12, más preferiblemente, SEQ ID NO: 3, 8, 9, 10 o 12.

- 5 En otra realización preferida, el aptámero utilizado en la presente invención contiene una secuencia de nucleótidos que se muestra en la SEQ ID NO: 2 o 7 (abarcada en la fórmula (2) mencionada anteriormente).

En otra realización preferida más, el aptámero utilizado en la presente invención contiene una secuencia de nucleótidos que se muestra en la SEQ ID NO: 1, 3, 4, 5, 6 u 8 (abarcada en la fórmula (3) mencionada anteriormente).

- 10 En una realización, el aptámero utilizado en la presente invención puede contener, en cualquiera de las secuencias de nucleótidos mencionadas anteriormente, una secuencia de nucleótidos en donde 1 o varios nucleótidos se sustituyen, delecionan, insertan o añaden, siempre que el aptámero todavía se una a FGF2, y puede ser

(a) un aptámero en donde, en los nucleótidos contenidos en el aptámero,

(i) la posición 2' de la ribosa de cada nucleótido de pirimidina es un átomo de flúor,

(ii) la posición 2' de la ribosa de cada nucleótido de purina es un grupo hidroxilo; o

- 15 (b) un aptámero en donde, en los nucleótidos contenidos en el aptámero,

(i) la posición 2' de la ribosa de cada nucleótido de pirimidina está independientemente no sustituida o sustituida con un átomo o grupo seleccionado del grupo que consiste en un átomo de hidrógeno, un grupo metoxi y un átomo de flúor,

(ii) la posición 2' de la ribosa de cada nucleótido de purina está independientemente no sustituida o sustituida con un átomo o grupo seleccionado del grupo que consiste en un átomo de hidrógeno, un grupo metoxi y un átomo de flúor.

Como se usa en la presente memoria, el número de los nucleótidos mencionados anteriormente sustituidos, deletados, insertados o añadidos no está particularmente limitado siempre que el aptámero todavía se una a FGF2 incluso después de la sustitución, delección, inserción o adición. Puede ser, por ejemplo, 1-aproximadamente 10, preferiblemente 1-6, más preferiblemente 1-5, más preferiblemente 1-4, más preferiblemente 1-3, lo más preferiblemente 1 o 2. Si bien el sitio del nucleótido a ser sustituido, deletado, insertado o añadido no está particularmente limitado siempre que el aptámero todavía se una a FGF2 incluso después de la sustitución, delección, inserción o adición, en los sitios especificados como un tipo de nucleótido en la fórmula (1), (2) y (3) mencionadas anteriormente (es decir, A, G, C o U), los nucleótidos se sustituyen, deletan, insertan o añaden en el sitio 1-3, preferiblemente 1 ó 2, más preferiblemente 1. Por otra parte, cuando pueden estar presentes varios tipos de nucleótidos en las fórmulas (1), (2) y (3) (es decir, N¹, N², N³, N⁴, N⁵, N⁶, N⁶¹ o N⁶²), se puede sustituir, deletar, insertar o añadir un mayor número de nucleótidos (por ejemplo, 1-aproximadamente 10, preferiblemente 1-6, más preferiblemente 1-5, más preferiblemente 1-4). Por ejemplo, cuando la secuencia de nucleótidos que se muestra en la SEQ ID NO: 3 es la secuencia original, la SEQ ID NO: 1 es la SEQ ID NO: 3 en la que el CC 3'-terminal se sustituye por UCGA, la SEQ ID NO: 4 es la SEQ ID NO: 3 en la que se deleta un nucleótido de cada uno de ambos extremos, la SEQ ID NO: 5 es la SEQ ID NO: 3 en la que G se añade al extremo 5' y C se añade al extremo 3', la SEQ ID NO: 6 es la SEQ ID NO: 3 en la que A se añade al extremo 5', la SEQ ID NO: 8 es la SEQ ID NO: 3 en la que la G 5'-terminal se sustituye por C, y la C 3'-terminal se sustituye por G, la SEQ ID NO: 9 es la SEQ ID NO: 3 en la que GG 5'-terminal se sustituye por CC, y CC 3'-terminal se sustituye por GG, la SEQ ID NO: 10 es la SEQ ID NO: 3 en la que la A número 14 se sustituye por G, y la U número 19 se sustituye por C, y la SEQ ID NO: 12 es la SEQ ID NO: 3 en la que la A número 17 se sustituye por U.

La longitud del aptámero utilizado en la presente invención no está particularmente limitada, y normalmente puede ser de aproximadamente 10 a aproximadamente 200 nucleótidos y puede ser, por ejemplo, no menos de aproximadamente 20 nucleótidos (por ejemplo no menos de 25 nucleótidos, no menos de 30 nucleótidos, no menos de 31 nucleótidos, no menos de 32 nucleótidos, no menos de 33 nucleótidos), preferiblemente no menos de 25 nucleótidos, más preferiblemente no menos de 30 nucleótidos, más preferiblemente no menos de 33 nucleótidos. Además, puede ser, por ejemplo, no más de aproximadamente 100 nucleótidos, generalmente no más de aproximadamente 80 nucleótidos, preferiblemente no más de aproximadamente 70 nucleótidos, más preferiblemente no más de aproximadamente 60 nucleótidos, más preferiblemente no más de aproximadamente 50 nucleótidos, además preferiblemente no más de aproximadamente 45 nucleótidos (por ejemplo no más de 44 nucleótidos, no más de 43 nucleótidos, no más de 42 nucleótidos, no más de 41 nucleótidos, no más de 40 nucleótidos). Cuando el número total de nucleótidos sea menor, la síntesis química y la producción en masa serán más fáciles, y habrá una gran ventaja importante en términos de costo. También se cree que la modificación química es fácil, la estabilidad en el cuerpo es alta y la toxicidad es baja.

Por lo tanto, la longitud del aptámero utilizado en la presente invención puede ser generalmente de aproximadamente 10-aproximadamente 200 nucleótidos, preferiblemente 20-80 nucleótidos, más preferiblemente 25-60 nucleótidos, más preferiblemente 30-45 nucleótidos.

El aptámero utilizado en la presente invención puede ser un conjugado seleccionado del grupo que consiste en un conjugado de varios aptámeros que contienen una secuencia de nucleótidos representada por la fórmula (1) mencionada anteriormente (aptámero (A)), un conjugado de varios aptámeros que contienen una secuencia de nucleótidos en donde 1 o varios nucleótidos están sustituidos, deletados, insertados o añadidos en la secuencia de nucleótidos representada por la fórmula (1) mencionada anteriormente (aptámero (B)), y un conjugado de 1 o varios aptámeros (A) y 1 o varios aptámeros (B). Estos conjugados también pueden unirse a FGF2.

Aquí, la conjugación se puede lograr mediante la unión en tándem. En la conjugación, se puede utilizar un conector. Como conector, se pueden mencionar cadenas de nucleótidos (p. ej., de 1 a aproximadamente 20 nucleótidos) y cadenas no nucleotídicas (p. ej., $-(CH_2)_n$ -conector, $-(CH_2CH_2O)_n$ -conector, conector de hexaetilenglicol, conector de TEG, conector que contiene péptidos, conector que contiene enlaces -SS-, conector que contiene enlaces -CONH-, conector que contiene enlaces -OPO₃-). La pluralidad mencionada en el conjugado anteriormente descrito de una pluralidad de los mismos no está particularmente limitada, siempre que sea dos o más, y la pluralidad puede ser, por ejemplo, 2, 3 o 4.

Cada nucleótido contenido en el aptámero utilizado en la presente invención es igual o diferente y puede ser un nucleótido que comprende un grupo hidroxilo en la posición 2' de la ribosa (por ejemplo, ribosa del nucleótido de pirimidina, ribosa del nucleótido de purina) (es decir, un nucleótido natural) o un nucleótido en donde el grupo hidroxilo está sustituido (modificado) por cualquier átomo o grupo en la posición 2' de la ribosa (a veces se indicará como "nucleótido modificado" en la presente memoria descriptiva).

Como ejemplos de cualquiera de dichos átomos o grupos, puede mencionarse un nucleótido sustituido por un átomo de hidrógeno, un átomo de flúor o un grupo -O-alquilo (por ejemplo, grupo -O-Me), un grupo -O-acilo (por ejemplo, grupo -O-CHO), o un grupo amino (por ejemplo, grupo -NH₂). En el aptámero utilizado en la presente invención, al menos un tipo (por ejemplo, 1, 2, 3 o 4 tipos) de nucleótido también puede ser un nucleótido modificado que comprende

un grupo hidroxilo, o cualquier átomo o grupo descrito anteriormente, por ejemplo, al menos dos tipos (por ejemplo, 2, 3 o 4 tipos) de grupos seleccionados del grupo que consiste en un átomo de hidrógeno, un átomo de flúor, un grupo hidroxilo y un grupo -O-Me, en la posición 2' de la ribosa.

En el aptámero utilizado en la presente invención, todos los nucleótidos de pirimidina pueden ser nucleótidos en donde la posición 2' de la ribosa es un átomo de flúor, o pueden ser iguales o diferentes, y nucleótidos en donde el átomo de flúor no está sustituido o está sustituido con cualquier átomo o grupo mencionado anteriormente, preferiblemente un átomo o grupo seleccionado del grupo que consiste en un átomo de hidrógeno, un grupo hidroxilo y un grupo metoxi. En particular, cuando se aplica un método de producción que utiliza el kit de transcripción DuraScribe™ T7 (fabricado por Epicentre) como método de producción del aptámero utilizado en la presente invención, se puede obtener un aptámero en donde la posición 2' de la ribosa de todos los nucleótidos de pirimidina está fluorada. El aptámero en donde el átomo de flúor está sustituido por otro átomo o grupo mencionado anteriormente puede producirse mediante el método que se menciona a continuación.

En el aptámero utilizado en la presente invención, todos los nucleótidos de purina pueden ser nucleótidos en donde la posición 2' de la ribosa es un grupo hidroxilo, o pueden ser iguales o diferentes, y nucleótidos en donde el grupo hidroxilo no está sustituido, o un nucleótido sustituido por cualquier átomo o grupo mencionado anteriormente, preferiblemente un átomo o grupo seleccionado del grupo que consiste en un átomo de hidrógeno, un grupo metoxi y un átomo de flúor en la posición 2' de la ribosa. El aptámero en donde un grupo hidroxilo está sustituido por otro átomo o grupo mencionado anteriormente puede producirse mediante el método mencionado a continuación.

En el aptámero utilizado en la presente invención, todos los nucleótidos de pirimidina pueden ser nucleótidos en donde el átomo de flúor en la posición 2' de la ribosa está sustituido por cualquiera de los átomos o grupos mencionados anteriormente, por ejemplo, los mismos átomos o grupos seleccionados del grupo que consiste en un átomo de hidrógeno, un grupo hidroxilo y un grupo -O-Me.

Además, en el aptámero utilizado en la presente invención, además, todos los nucleótidos de purina pueden ser nucleótidos en donde el grupo hidroxilo en la posición 2' de la ribosa está sustituido por cualquiera de los átomos o grupos mencionados anteriormente, por ejemplo, los mismos átomos o grupos seleccionados del grupo que consiste en un átomo de hidrógeno, un átomo de flúor y un grupo -O-Me.

En una realización preferible, cada nucleótido de pirimidina contenido en el aptámero utilizado en la presente invención es un nucleótido que contiene un átomo de flúor en la posición 2' de la ribosa, y cada nucleótido de purina es un nucleótido que tiene un grupo hidroxilo en la posición 2' de la ribosa. En otra realización, el átomo de flúor mencionado anteriormente en la posición 2' de la ribosa de cada nucleótido de pirimidina está opcionalmente sustituido independientemente por un átomo o grupo seleccionado del grupo que consiste en un átomo de hidrógeno, un grupo hidroxilo y un grupo metoxi, y el grupo hidroxilo mencionado anteriormente en la posición 2' de la ribosa de cada nucleótido de purina está opcionalmente sustituido independientemente por un átomo o grupo seleccionado del grupo que consiste en un átomo de hidrógeno, un grupo metoxi y un átomo de flúor.

En esta descripción, se asume que los nucleótidos que constituyen el aptámero son ARN (es decir, se asume que los grupos de azúcar son ribosa) al describir cómo se modifican los grupos de azúcar en los nucleótidos. Sin embargo, esto no significa que el ADN esté exento de los nucleótidos que constituyen el aptámero, y una modificación del ARN debe leerse como una modificación del ADN, según sea apropiado. Cuando el nucleótido que constituye el aptámero es ADN, por ejemplo, el reemplazo del grupo hidroxilo en la posición 2' de la ribosa por X debe interpretarse como un reemplazo de un átomo de hidrógeno en la posición 2' de la desoxirribosa por X.

Cuando el uracilo se sustituye por timina en el aptámero de la presente invención, se puede aumentar la actividad de unión de FGF2, la actividad inhibidora de la unión FGF2-receptor de FGF, la estabilidad, la capacidad de administración del fármaco y la estabilidad en la sangre del aptámero y similares.

En el aptámero utilizado en la presente invención, 1 o varios, por ejemplo, 1-2, 1-3, 1-4, 1-5 nucleótidos de enlace diéster del ácido fosfórico en el nucleótido pueden modificarse o sustituirse por cualquier sustituyente(s). Por ejemplo, el enlace diéster del ácido fosfórico puede sustituirse por un enlace fósforotioato, un enlace fósforoditioato, un enlace alquilfosfonato, un enlace fósforamidato y similares. Aquí, por ejemplo, "el nucleótido está sustituido por un enlace fósforotioato" significa que un grupo de ácido fosfórico en un sitio de unión entre nucleótidos adyacentes está sulfurado, es decir, un enlace fosfodiéster se altera a un enlace fósforotioato.

En el aptámero utilizado en la presente invención, uno o varios, por ejemplo, 1-2, 1-3, 1-4, 1-5 nucleótidos pueden sustituirse por ácido nucleico con puente (BNA) o ácido nucleico bloqueado (LNA) para estabilizar el aptámero y mejorar la actividad del mismo. Como se usa en la presente memoria, el "ácido nucleico con puente" se refiere a uno que tiene una estructura en donde la afinidad de unión a una secuencia complementaria se mejora restringiendo el grado de libertad del ácido nucleico por entrecruzamiento intramolecular y adquiere resistencia a las nucleasas. Los ejemplos de los mismos incluyen, pero no se limitan a, 2',4'-BNA (ácido nucleico bloqueado (LNA)), ácido nucleico con puente de 2'-O,4'-C-etileno (ENA) y similares.

El aptámero utilizado en la presente invención puede ser uno en donde un residuo de azúcar (por ejemplo, ribosa) de cada nucleótido se ha modificado para aumentar la actividad de unión a FGF2, la estabilidad, la capacidad de administración del fármaco y similares. Como ejemplos de modificación en un residuo de azúcar, se pueden mencionar el reemplazo del átomo de oxígeno en la posición 2', posición 3' y/o posición 4' del residuo de azúcar con otro átomo, y similares. Como el tipo de modificación, pueden mencionarse fluoración, O-alkilación (por ejemplo, O-metilación, O-etilación), O-arilación, S-alkilación (por ejemplo, S-metilación, S-etilación), S-arilación y aminación (por ejemplo, -NH₂). Además, los ejemplos de los mismos incluyen 4'-SRNA en donde el oxígeno de la posición 4' se reemplaza con azufre, LNA (ácido nucleico bloqueado) en donde la posición 2' y la posición 4' están reticuladas mediante metileno, ácido nucleico 3'-N-fósforamido en donde el grupo hidroxilo en la posición 3' se reemplaza con un grupo amino y similares. El aptámero utilizado en la presente invención a veces se produce con una modificación dada del átomo de oxígeno en la posición 2' de la ribosa del nucleótido de pirimidina, debido al método de producción del mismo.

Cuando se aplica un método de producción que utiliza, por ejemplo, el kit de transcripción DuraScribe™ T7 (fabricado por Epicentre) como método de producción del aptámero utilizado en la presente invención, se produce un aptámero en donde la posición 2' de la ribosa de preferiblemente todos los nucleótidos de pirimidina está fluorada. Por lo tanto, es posible producir diversas variaciones de aptámeros que tengan actividad mejorada incluso aunque la secuencia de bases sea la misma, aplicando dicha alteración en el residuo de azúcar al aptámero obtenido. De lo anterior, el aptámero utilizado en la presente invención puede ser preferiblemente un aptámero en donde se modifica un residuo de azúcar de al menos un nucleótido. Dichas alteraciones en el residuo de azúcar se pueden realizar mediante un método conocido *per se* (véase, por ejemplo, Sproat et al., (1991) Nucl. Acid. Res. 19, 733-738; Cotton et al., (1991) Nucl. Acid. Res. 19, 2629-2635; Hobbs et al., (1973) Biochemistry 12, 5138-5145). Para ser específico, se puede producir un aptámero en donde el grupo hidroxilo en la posición 2' de la ribosa está sustituido por un átomo o grupo seleccionado del grupo que consiste en un átomo de hidrógeno, un grupo hidroxilo y un grupo metoxi usando, como base, un aptámero en donde el grupo hidroxilo en la posición 2' de la ribosa de todos los nucleótidos de pirimidina está sustituido por un grupo flúor.

El aptámero utilizado en la presente invención también puede tener una base de ácido nucleico (por ejemplo, purina o pirimidina) alterada (por ejemplo, sustitución química) para mejorar la actividad de unión a FGF2, la prevención de la multimerización, la estabilidad, la capacidad de administración del fármaco y similares. Como ejemplos de dichas alteraciones, se puede mencionar la alteración de pirimidina en la posición 5, la alteración de purina en las posiciones 6 y/u 8, la alteración con una amina extracíclica, la sustitución con 4-tiouridina y la sustitución con 5-bromo o 5-yodo-uracilo. El grupo fosfato contenido en el aptámero utilizado en la presente invención puede alterarse para conferir resistencia a la nucleasa y la hidrólisis. Por ejemplo, el grupo P(O)O se puede reemplazar con P(O)S (tioato), P(S)S (ditioato), P(O)N(R)R' (amidato), P(O)R, P(O)OR, CO o CH₂ (formacetal) o 3'-amina (-NH-CH₂-CH₂-) [en donde cada unidad de R o R' es independientemente H o un alquilo sustituido o no sustituido (por ejemplo, metilo, etilo)].

El grupo de enlace es, por ejemplo, -O-, -N- o -S-, y los nucleótidos pueden unirse a un nucleótido contiguo a través de estos grupos de enlace.

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

Además, se puede realizar una alteración añadiendo a un extremo un polietilenglicol (PEG), aminoácido, péptido, dT invertida, ácido nucleico, nucleósidos, miristoilo, litocólico-oleilo, docosanilo, lauroilo, estearoilo, palmitoilo, oleoilo, linoleoilo y otros lípidos, esteroides, colesterol, cafeína, vitaminas, colorantes, sustancias fluorescentes, agentes anticancerosos, toxinas, enzimas, sustancias radiactivas, biotina y similares. Para dichas modificaciones, véanse, por ejemplo, las Patentes de EE. UU. 5.660.985 y 5.756.703.

En particular, cuando la alteración se realiza mediante la adición terminal de PEG, el peso molecular de PEG no está particularmente limitado y es preferiblemente 1.000-100.000, más preferiblemente 30.000-90.000. El PEG puede ser lineal o ramificado en dos o más cadenas (PEG de múltiples brazos). La adición terminal de PEG es útil para prevenir la multimerización del aptámero mencionado a continuación.

Dicho PEG no está particularmente limitado, y los expertos en la técnica pueden seleccionar y usar apropiadamente PEG conocido o disponible comercialmente (por ejemplo, http://www.peg-drug.com/peg_product/branched.html). Los ejemplos preferibles específicos del PEG que se aplicará al aptámero utilizado en la presente invención incluyen PEG tipo GS de 2 ramas que tiene un peso molecular de 40.000 (SUNBRIGHT GL2-400GS fabricado por NOF CORPORATION), PEG de tipo TS de 2 ramas que tiene un peso molecular de 40.000 (SUNBRIGHT GL2-400TS fabricado por NOF CORPORATION), PEG tipo TS de 4 ramas que tiene un peso molecular de 40.000 (SUNBRIGHT GL4-400TS fabricado por NOF CORPORATION), PEG tipo TS de 2 ramas que tiene un peso molecular de 80.000 (SUNBRIGHT GL2-800TS fabricado por NOF CORPORATION), PEG tipo TS de 4 ramas que tiene un peso molecular de 80.000 (SUNBRIGHT GL4-800TS fabricado por NOF CORPORATION) y similares.

En este caso, en el aptámero utilizado en la presente invención, se puede añadir PEG directamente al extremo. Es más preferible que se añada al extremo del mismo un conector que tenga un grupo que se pueda unir a PEG y similares, y que el PEG se añada al aptámero utilizado en la presente invención a través del conector.

El conector para PEG y el aptámero utilizado en la presente invención no está particularmente limitado, y el número de cadena de carbonos, el grupo funcional y similares se pueden seleccionar apropiadamente según el sitio de unión, el tipo de PEG y similares. Los ejemplos de dicho conector incluyen un conector que tiene un grupo amino. Específicamente, cuando se añade al extremo 5', se puede mencionar el conector ssH (SAFC) o DMS(O)MT-AMINO-MODIFICADOR (GLEN RESEARCH), y cuando se añade al extremo 3', se puede mencionar TEA Amino C-6 lcaa CPG (ChemGenes) y similares. Cuando se selecciona este conector, por ejemplo, se añade un grupo activo de N-hidroxisuccinimida al PEG y se hace reaccionar con un grupo amino en el lado del conector, mediante lo cual el aptámero utilizado en la presente invención puede unirse a PEG a través del conector.

- 5
- 10 Como PEG y conector, se pueden utilizar preferiblemente productos disponibles comercialmente. Las condiciones de la reacción y similares relacionadas con la unión de PEG, un conector y el aptámero utilizado en la presente invención pueden ser determinadas apropiadamente por los expertos en la técnica.

Las realizaciones más preferidas del aptámero utilizado en la presente invención incluyen el aptámero ID1 que contiene la secuencia de nucleótidos que se muestra en la SEQ ID NO: 3:

GL2-400TS-C6-

G (M) G (M) G (M) A (M) U (M) A (M) C (M) U (F) A (M) G (M) G (M) GC (M) A (M) U (M) U (F) A (M) A (M) U (M) G (M) U (F) U (M) A (M) C (M) C (M) A (M) GU (F) GU (F) A (M) G (M) U (M) C (M)) C (M) C (M) -1dT;

- 15 el aptámero ID2 que contiene la secuencia de nucleótidos que se muestra en la SEQ ID NO: 8:

GL2-400TS-C6-

C (M) G (M) G (M) A (M) U (M) A (M) C (M) U (F) A (M) G (M) G (M) GC (M) A (M) U (M) U (F) A (M) A (M) U (M) G (M) U (F) U (M) A (M) C (M) C (M) A (M) GU (F) GU (F) A (M) G (M) U (M) C (M)) C (M) G (M) -1dT;

el aptámero ID3 que contiene la secuencia de nucleótidos que se muestra en la SEQ ID NO: 9:

GL2-400TS-C6-

C (M) C (M) G (M) A (M) U (M) A (M) C (M) U (F) A (M) G (M) G (M) GC (M) A (M) U (M) U (F) A (M) A (M) U (M) G (M) U (F) U (M) A (M) C (M) C (M) A (M) GU (F) GU (F) A (M) G (M) U (M) C (M)) G (M) G (M) -1dT;

el aptámero ID4 que contiene la secuencia de nucleótidos que se muestra en la SEQ ID NO: 10:

GL2-400TS-C6-

G (M) G (M) G (M) A (M) U (M) A (M) C (M) U (F) A (M) G (M) G (M) GC (M) G (M) U (M) U (F) A (M) A (M) C (M) G (M) U (F) U (M) A (M) C (M) C (M) A (M) GU (F) GU (F) A (M) G (M) U (M) C (M)) C (M) C (M) -1dT;

20

el aptámero ID5 que contiene la secuencia de nucleótidos que se muestra en la SEQ ID NO: 12:

GL2-400TS-C6-

G (M) G (M) G (M) A (M) U (M) A (M) C (M) U (F) A (M) G (M) G (M) GC (M) A (M) U (M) U (F) U (M) A (M) U (M) G (M) U (F) U (M) A (M) C (M) C (M) A (M) GU (F) GU (F) A (M) G (M) U (M) C (M)) C (M) C (M) -1dT; y

el aptámero ID6 que contiene la secuencia de nucleótidos que se muestra en la SEQ ID NO: 3:

idT-

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

En cada una de las fórmulas mencionadas anteriormente, los paréntesis en cada nucleótido indican la modificación de la posición 2' de la ribosa, F es un átomo de flúor y M es un grupo metoxi.

- 5 Independientemente de cuál de estos aptámeros se utilice, estos aptámeros pueden estar presentes de manera estable en la constitución de la preparación de aptámeros de la presente invención y, por lo tanto, son adecuados como ingrediente activo de la preparación de aptámeros de la presente invención.

10 El aptámero utilizado en la presente invención puede ser una forma libre o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. Los ejemplos de tales sales incluyen sal metálica, sal de amonio, sal de adición de amina orgánica, sal de adición de aminoácidos y similares. Los ejemplos de sal metálica incluyen sales de metales alcalinos tales como sal de sodio, sal de potasio y similares, sales de metales alcalinotérreos tales como sal de magnesio, sal de calcio y similares, sal de aluminio, sal de zinc y similares. Los ejemplos de sal de amonio incluyen sales tales como amonio, tetrametilamonio y similares. Los ejemplos de sal de adición de amina orgánica incluyen sales tales como trishidroxiaminometano y similares. Los ejemplos de sal de adición de aminoácidos incluyen sales de lisina, arginina, histidina, triptófano, ornitina y similares.

- 15 La concentración del aptámero para FGF2 utilizado en la presente invención no está particularmente limitada, y el aptámero puede estar contenido en cualquier cantidad siempre que la preparación de aptámero de la presente invención ejerza la eficacia y el efecto deseados. En la presente memoria descriptiva, la "concentración del aptámero" significa la proporción (mg/ml) del peso de la parte de ácido nucleico unida por el enlace fosfato 5'→3' que constituye la molécula de aptámero con respecto al volumen de toda la preparación. La concentración del aptámero es, por ejemplo, 1-60 mg/ml.

20 Cuando la concentración del aptámero para FGF2 excede los 20 mg/ml, tiende a producirse fácilmente un multímero del aptámero incluso a la temperatura general de almacenamiento de 4-5 °C. El aptámero para FGF2, cuando está presente como monómero, se une a FGF2 e inhibe la función de FGF2 y ejerce su eficacia. Sin embargo, cuando se multimeriza, la unión a FGF2 no se observa en un ensayo que utiliza viacore. Se considera así que el aptámero no inhibe la función de FGF2 (véase el Ejemplo 4). Cuando la concentración del aptámero es baja, la distancia intermolecular es larga y la tendencia a multimerizar es baja. Sin embargo, cuando la concentración del aptámero excede los 20 mg/ml, el aptámero se multimeriza incluso a la temperatura general de almacenamiento de 4-5 °C, como resultado de lo cual la actividad de unión a FGF2 tiende a disminuir en su conjunto (véase el Ejemplo 5). Por lo tanto, el límite superior de la concentración del aptámero de FGF2 en la preparación de aptámero de la presente invención es deseablemente una concentración que no exceda 20 mg/ml. Además, cuando la concentración del aptámero en la preparación de aptámero de la presente invención es baja, es posible que no se obtenga el efecto como una inyección. Por lo tanto, aunque el límite inferior de la concentración del aptámero en la preparación de aptámero de la presente invención no está particularmente limitado siempre que se pueda obtener el efecto como una inyección, es deseable, por ejemplo, una concentración de no menos de 1 mg/ml.

- 35 La forma de dosificación de la preparación de aptámero de la presente invención no está particularmente limitada siempre que sea un líquido acuoso. Preferiblemente es una inyección. Dado que la preparación de aptámero de la presente invención es un líquido acuoso, el aptámero para FGF2, que es el ingrediente activo, se disuelve en un disolvente.

40 Es bien sabido que los aptámeros generalmente requieren una sal inorgánica, que es un electrolito fuerte, para mantener su estructura de orden superior. Macugen (marca comercial registrada), que es el único producto farmacéutico de aptámero actualmente en el mercado, también contiene hidrógenofosfato de sodio, dihidrógenofosfato de sodio, un agente de isotonicidad y un ajustador de pH. Se ha mostrado que Macugen en este estado es estable durante 6 meses en un ensayo acelerado a 25 ± 2 °C y durante 36 meses en un ensayo de almacenamiento a largo plazo a 5 ± 3 °C. A partir de esto, los expertos en la técnica deberían considerar que una sal inorgánica (electrolito) es necesaria para la existencia estable del aptámero en una inyección mientras se mantiene la estructura de orden superior del aptámero.

45 Sin embargo, como se muestra en el Ejemplo mencionado a continuación, se encontró que cuando se usa PBS o solución salina fisiológica como disolvente, el aptámero mencionado anteriormente para FGF2, que es el ingrediente activo en la presente invención, tiende a perder estabilidad y formar un multímero debido a la influencia de la sal inorgánica que es un electrolito fuerte y, como resultado, pierde la actividad de unión a FGF2. Por lo tanto, los presentes inventores usaron agua libre de una sal inorgánica (electrolito) como disolvente y encontraron inesperadamente que se suprimió la multimerización del aptámero de FGF2 y aumentó la proporción de aptámero de FGF2 presente como monómero (véase el Ejemplo 3).

Sin desear quedar ligado a ninguna teoría, cuando un aptámero de FGF2 se disuelve en agua, el valor de T_m del aptámero de FGF2 no se puede medir como se muestra en el Ejemplo 1, y el desplazamiento de protones en RMN no se puede observar como se muestra en el Ejemplo 2. Por lo tanto, se asume que el aptámero de FGF2 disuelto en agua existe como un monómero en un estado de estar completamente estirado. Es decir, se cree que la estructura de orden superior del aptámero, que se considera necesaria para la construcción de la actividad, se destruye utilizando agua libre de sales inorgánicas como disolvente, se desnaturaliza y existe en un estado monocatenario, por lo que se puede evitar la desactivación (multimerización). Además, como se muestra en los Ejemplos 4 y 5, cuando se realizó el ensayo de resonancia de plasmón superficial (SPR) disolviendo en una solución que contenía un electrolito, el aptámero de FGF2 mantuvo la actividad de unión a FGF2. Por lo tanto, se demostró que, cuando el aptámero de FGF2 disuelto en agua se administra en el cuerpo, la estructura de orden superior requerida para la actividad del aptámero se reconstruye mediante la acción del electrolito presente en el fluido corporal, y puede exhibir la actividad.

Como se describió anteriormente, se reveló que una formulación de preparación en la que la estructura de orden superior del aptámero de FGF2 se destruye intencionalmente para provocar un estado completamente alargado disolviendo el aptámero en un disolvente libre de un electrolito, evitando así también la multimerización durante el almacenamiento a largo plazo y que, después de la administración, la estructura de orden superior se reconstruye mediante exposición a una concentración de sal fisiológica y la eficacia ejercida puede eventualmente mantener la actividad del aptámero de FGF2 durante un largo plazo. La presente invención se ha completado verificando en detalle el modo de existencia del aptámero en dicha solución, y no puede ser fácilmente imaginada ni siquiera por los expertos en la técnica.

De lo anterior, el disolvente usado para la preparación de aptámero de la presente invención es preferiblemente un disolvente acuoso libre de una sal inorgánica (electrolito), y es particularmente preferible el agua.

Como se describió anteriormente, dado que se usa un disolvente libre de una sal inorgánica (electrolito) para la preparación del aptámero de la presente invención, la presión osmótica es baja y la preparación no se puede usar como una inyección tal como está. Por lo tanto, la preparación de aptámero de la presente invención se caracteriza porque contiene un osmorregulador no electrolítico (osmolito) con el fin de ajustar la relación de presión osmótica con respecto a la presión osmótica del plasma a 1 o más, preferiblemente 1-3.

El osmorregulador usado para la preparación de aptámeros de la presente invención es manitol.

La cantidad del osmorregulador no está particularmente limitada, y los expertos en la técnica pueden cambiar apropiadamente la cantidad de aptámero de FGF2 en la preparación según el tipo (peso molecular) del osmorregulador que se va a usar y la presión osmótica diana. Por ejemplo, cuando se utiliza manitol como osmorregulador y la relación entre la presión osmótica y la solución salina fisiológica es aproximadamente 1, la relación de mezcla del osmorregulador en toda la inyección es del 2-7,5 % (p/v). Más específicamente, cuando la relación entre la presión osmótica y la solución salina fisiológica es 1, la relación de mezcla de manitol es el 4,9 % cuando la concentración del aptámero de FGF2 mencionado anteriormente es 2 mg/ml, y la relación de mezcla de manitol es el 3,6 % cuando la concentración del aptámero de FGF2 mencionado anteriormente es 20 mg/ml.

La preparación de aptámero de la presente invención preferiblemente está sustancialmente libre de un electrolito distinto del aptámero para que FGF2 o una sal del mismo sea el ingrediente activo. Como se usa en la presente memoria, "sustancialmente libre" significa que puede contener una pequeña cantidad de electrolito siempre que el aptámero de FGF2 en la preparación pueda almacenarse de manera estable durante un largo plazo. Más preferiblemente, la preparación de aptámero de la presente invención no contiene un electrolito distinto del aptámero para que FGF2 o una sal del mismo sea el ingrediente activo.

La preparación de aptámero de la presente invención puede contener además un aditivo farmacéuticamente aceptable cuando sea necesario. Los ejemplos de tales aditivos incluyen estabilizadores, conservantes, solubilizantes, tampones, ajustadores de pH, agentes calmantes y similares, y preferiblemente se pueden usar aditivos farmacéuticos no electrolíticos bien conocidos que se usan convencionalmente como aditivos para inyecciones.

El pH de la preparación de aptámero de la presente invención no está particularmente limitado. Cuando la preparación se usa como una inyección, el pH es deseablemente cercano a neutro y puede seleccionarse apropiadamente dentro del rango de, por ejemplo, 5 a 9, preferiblemente 6 a 8. Cuando un aptámero para FGF2 o una sal del mismo, que es el ingrediente activo, se disuelve en agua, el pH de la solución se encuentra dentro del rango mencionado anteriormente. Por lo tanto, no es necesario añadir un ajustador o tampón de pH de electrolito a la preparación de aptámero de la presente invención.

La preparación de aptámero de la presente invención puede contener otros ingredientes activos siempre que no afecten adversamente a la actividad y estabilidad del aptámero de FGF2. Como tal ingrediente activo, pueden estar contenidos inhibidores de VEGF tales como McGen (marca comercial registrada), Lucentis (marca comercial registrada), Eylea (marca comercial registrada), Avastin (marca comercial registrada) y similares como fármacos terapéuticos para enfermedades acompañadas de angiogénesis y similares, agentes antiinflamatorios tales como esteroides y similares, preparaciones de hormona de crecimiento humana tales como Norditropina (marca comercial registrada) y Genotropina (marca comercial registrada) como agentes terapéuticos para enfermedades óseas y

similares, y agentes analgésicos/sedantes tales como morfina. Los ejemplos de los mismos incluyen compuestos farmacéuticos para tratar o prevenir enfermedades acompañadas de angiogénesis tales como degeneración macular relacionada con la edad y similares, enfermedades de huesos o cartílagos tales como osteoporosis, artritis reumatoide, osteoartritis, fracturas óseas y similares, y dolor.

- 5 La preparación de aptámero de la presente invención que tiene el constituyente mencionado anteriormente es estable a 4 °C durante no menos de 3 meses. Como se usa en la presente memoria, "estable" significa que la proporción de un aptámero monómero en la preparación después del almacenamiento de la preparación contenida en una botella de vidrio a 4 °C no es inferior al 70 %, como se mencionó anteriormente. Preferiblemente, en la preparación de aptámero de la presente invención, la proporción de un aptámero monómero en la preparación después del almacenamiento a 4 °C durante 3 meses no es inferior al 80 %. Además, la preparación de aptámero de la presente invención es estable incluso cuando se expone a iluminación fluorescente blanca o iluminación fluorescente de ultravioleta cercano.

- 10 Por lo tanto, la preparación de aptámero de la presente invención se puede almacenar de forma estable durante un largo plazo en forma de un líquido acuoso tal cual, preferiblemente en una forma de dosificación de una inyección tal como una jeringa precargada, un cartucho o similar, refrigerando a no más de 5 °C y es extremadamente fácil de manipular.

- 15 La preparación de aptámero de la presente invención se puede usar preferiblemente, por ejemplo, como un medicamento para tratar o prevenir enfermedades acompañadas de angiogénesis tales como degeneración macular relacionada con la edad y similares, enfermedades de huesos o cartílagos tales como osteoporosis, artritis reumatoide, osteoartritis, fractura ósea y similares.

- 20 La preparación de aptámero de la presente invención se puede administrar por vía parenteral (por ejemplo, administración intravenosa, administración subcutánea, administración intramuscular, administración tópica, administración intraperitoneal, administración intranasal, administración pulmonar, administración por instilación y similares). La dosificación de la preparación de aptámero de la presente invención varía dependiendo del tipo y actividad del aptámero de FGF2, la gravedad de la enfermedad, la especie animal objeto de administración, la tolerabilidad del fármaco del sujeto de administración, el peso corporal, la edad y similares, y la dosificación habitual, basada en la cantidad de ingrediente activo (sitio de oligonucleótido del aptámero) por día para un adulto, puede ser de aproximadamente 0,0001 a aproximadamente 100 mg/kg, por ejemplo, de aproximadamente 0,0001 a aproximadamente 10 mg/kg, preferiblemente de aproximadamente 0,005 a aproximadamente 1 mg/kg.

- 30 Ejemplo

La presente invención se explica con más detalle a continuación haciendo referencia a los Ejemplos; sin embargo, la presente invención no está limitada por los Ejemplos.

Ejemplo 1 (Análisis estructural del aptámero de FGF2 en disolvente: determinación del valor de T_m)

- 35 La estructura del aptámero que se muestra en el aptámero ID1 se muestra a continuación. La letra mayúscula muestra ARN, la letra minúscula muestra ADN e idT muestra dT invertida. El paréntesis en cada nucleótido muestra la modificación en la posición 2' del mismo, F muestra un átomo de flúor y M muestra un grupo O-metilo. C6 muestra - (CH₂)₆-conector. PEG40TS2 es polietilenglicol de tipo TS de 2 ramas que tiene un peso molecular de 40.000 (SUNBRIGHT GL2-400TS fabricado por NOF CORPORATION).

aptámero ID1:

GL2-400TS-C6-

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

- 40 El aptámero representado por el aptámero ID1 se disolvió en agua hasta una concentración de 0,1 mg/ml y en PBS o solución salina fisiológica hasta una concentración de 0,06 mg/ml. La solución obtenida se calentó a 95 °C durante 5 min, se enfrió hasta temperatura ambiente y se usó para llenar en una cubeta de vidrio de cuarzo. El valor de T_m se determinó midiendo la absorción de UV con un espectrofotómetro mientras se cambiaba la temperatura de 20 °C a 90 °C.

- 45 Como resultado, el valor de T_m fue 60,1 °C en PBS y 69,6 °C en solución salina fisiológica. Por otro lado, no se observó ningún valor particular de T_m en agua. A partir de esto, se asumió que el aptámero representado por el aptámero ID1 forma una estructura de orden superior mediante interacción intermolecular en PBS o solución salina fisiológica, que generalmente puede ser un disolvente para inyecciones. Además, se asumió que el aptámero representado por el aptámero ID1 no forma un par de bases entre moléculas o dentro de la molécula, y no forma una estructura de orden superior en agua libre de electrolito.

- 50

Ejemplo 2 (Análisis estructural del aptámero de FGF2 en óxido de deuterio: medición del espectro de RMN)

Se usó para llenar un vial de vidrio un aptámero de 20 mg representado por el aptámero ID1 y se disolvió en aproximadamente 1 ml de óxido de deuterio para preparar una muestra de medición. Se midió utilizando un espectrómetro de RMN Bruker Avance de 600 MHz. Como resultado, no se observó una señal de iminoprotón derivada de la formación de pares de bases, que debería observarse en un campo magnético inferior a 8 ppm.

A partir de ahí, se asumió que el aptámero representado por el aptámero ID1 no forma un par de bases entre moléculas o dentro de la molécula, y no forma una estructura de orden superior en agua libre de electrolito.

Ejemplo 3 (Análisis estructural del aptámero de FGF2 en solución que contiene electrolito: medición SEC-MALS)

El aptámero representado por el aptámero ID1 se disolvió en solución salina fisiológica hasta una concentración de 20 mg/ml y se incubó a 37 °C durante 2 semanas para preparar artificialmente una preparación de aptámero de FGF2 que forma una estructura de orden superior. La preparación y una muestra obtenida congelando y almacenando inmediatamente después de la preparación para minimizar la formación de estructuras de orden superior, se diluyeron cada una con solución salina fisiológica hasta 0,2 mg/ml y se sometieron a análisis.

Los monómeros y multímeros se separaron mediante cromatografía de exclusión por tamaño y los respectivos pesos moleculares se midieron con un detector MALS (Dispersión de la Luz de Ángulo Múltiple) fabricado por Wyatt Technology. La cromatografía de exclusión por tamaño se realizó mediante ACQUITY UPLC fabricado por Waters y utilizando una columna BEH200 SEC.

Como resultado, se midió que el peso molecular del pico que parecía ser un monómero era aproximadamente 64.000, y se midió que el peso molecular del pico que parecía ser una estructura de orden superior compuesta de multímeros era aproximadamente 122.000. A partir de los resultados, se encontró que la estructura de orden superior formada por el aptámero representado por el aptámero ID1 en agua que contiene un electrolito es un dímero.

Ejemplo 4 (Correlación entre el porcentaje de contenido de monómero y la actividad de unión del aptámero)

El aptámero representado por el aptámero ID1 se disolvió en PBS, solución salina fisiológica o solución acuosa de manitol al 3,3 % hasta una concentración de 20 mg/ml o 2 mg/ml para preparar preparaciones de aptámero de FGF2 que muestran diversos porcentajes de contenido de monómero en las condiciones de almacenamiento que se muestran en la Tabla 1. El contenido de monómero de cada una de las preparaciones de aptámero de FGF2 preparadas se determinó mediante cromatografía de exclusión por tamaño. Los resultados de los mismos también se muestran en la Tabla 1.

La actividad de unión de cada una de las preparaciones de aptámero de FGF2 a la proteína FGF2 se midió mediante resonancia de plasmón superficial (SPR) usando Biacore T200 fabricado por GE. Como chip sensor se utilizó CM4, que reacciona con un grupo amino. Se disolvió FGF2 humano en solución de inmovilización (acetato de sodio 10 mM, pH 6) a 10 µg/ml. Para la reacción de un grupo amino en el lado de la proteína y un grupo carboxilo en el lado del chip, se usaron hidrócloruro de etil-3-carbodiimida y N-hidroxisuccinimida. Después de la reacción, se realizó el bloqueo con etanolamina. La cantidad inmovilizada de FGF2 se fijó en 1.000 RU. Se preparó un aptámero para el analito a 5 µM. Como tampón de procesamiento, se usaron cloruro de sodio 295 mM, cloruro de potasio 5,4 mM, cloruro de magnesio 0,8 mM, cloruro de calcio 1,8 mM, Tris 20 mM, Tween20 al 0,05 %, pH 7,6), y se usó cloruro 2M como solución de regeneración. Se inmovilizó FGF2 en una celda de flujo FC2 o FC4 y se restaron los resultados de FC1 o FC3 para dar un sensorgrama final. La actividad se evaluó como un valor relativo respecto al estándar de preparación de aptámero de FGF2 que tiene un contenido de multímero extremadamente bajo y se preparó cuando estaba en uso usando una solución libre de electrolito.

La Tabla 1 muestra el método de preparación, el porcentaje del contenido de monómero y los resultados de la medición de la actividad de unión a la proteína FGF2 de las respectivas preparaciones de aptámero de FGF2. A partir de los resultados, se aclaró que el contenido de monómero de la preparación de aptámero de FGF2 y la actividad de unión a la proteína FGF2 están correlacionados.

Tabla 1

Porcentaje de contenido de monómero y actividad de unión a la proteína FGF2 de la preparación de aptámero de FGF2

Preparación de aptámero de FGF2	método de preparación (condiciones de almacenamiento)	porcentaje de contenido de monómero (%)	actividad de unión (%)
Preparación de manitol al 3,3 % de 2 mg/mL	preparación a pedido	98,7	98,1

Preparación de manitol al 3,3 % de 20 mg/ml	preparación a pedido	91,3	91,6
Preparación de manitol al 3,3 % de 20 mg/ml	25 °C 1 semana	80,5	75,7
Preparación de manitol al 3,3 % de 20 mg/ml	25 °C 2 semanas	71,5	65,2
Preparación de manitol al 3,3 % de 20 mg/ml	25 °C 1 mes	63,4	57,2
Preparación de manitol al 3,3 % de 20 mg/ml	25 °C 3 meses	50,2	50,2
2 mg/mL de solución salina fisiológica	37 °C 2 días	56,9	56,2
2 mg/ml de PBS	37 °C 2 días	57,2	60,6
20 mg/mL de solución salina fisiológica	37 °C 2 días	12,1	18,3
20 mg/ml de PBS	37 °C 2 días	11,3	13,1

Ejemplo 5 (Ensayo de estabilidad de la preparación de aptámero de FGF2)

El aptámero representado por el aptámero ID1 se disolvió en solución de manitol al 3,3 % o 3,6 % o 4,9 % hasta una concentración de 20 mg/mL o 2 mg/mL, se almacenó durante 3 meses en diversas condiciones de temperatura que se muestran en la Tabla 2, y el porcentaje de contenido de monómero y la actividad de unión se midieron mediante cromatografía de exclusión por tamaño y el método de SPR. Los resultados se muestran en la Tabla 2.

5

A partir de los resultados, se aclaró que una preparación de aptámero de FGF2 preparada usando una solución acuosa de manitol libre de electrolito es estable.

Tabla 2

Resultados del ensayo de estabilidad de la preparación del aptámero de FGF2

concentración de la preparación (mg/mL)	solución	temperatura de almacenamiento	porcentaje de contenido de monómero (%)	actividad de unión (%)
2	manitol al 3,3 %	-20 °C	98,4	102,0
2	manitol al 3,3 %	5 °C	99,1	102,7
20	manitol al 3,3 %	-20 °C	89,2	91,0
20	manitol al 3,3 %	5 °C	88,5	90,8
2	manitol al 4,9 %	-20 °C	98,3	101,0
2	manitol al 4,9 %	5 °C	98,0	103,1
20	manitol al 3,6 %	-20 °C	88,8	84,1
20	manitol al 3,6 %	5 °C	88,0	81,8

10 Ejemplo 6 (Resultados en otras preparaciones de aptámero de FGF2)

Los aptámeros representados por el aptámero ID2 - 6 se disuelven en agua (solución acuosa de manitol), solución salina fisiológica o PBS hasta concentraciones apropiadas para preparar preparaciones de aptámero de FGF2. Las preparaciones de aptámero de FGF2 obtenidas respectivamente se almacenan en diversas condiciones de temperatura y temperatura de almacenamiento durante varios meses, y el porcentaje del contenido de monómero y la actividad de unión se miden mediante cromatografía de exclusión por tamaño y el método de SPR.

15

aptámero ID2:

GL2-400TS-C6-

C (M) G (M) G (M) A (M) U (M) A (M) C (M) U (F) A (M) G (M) G (M) GC (M) A (M) U (M) U (F) A (M) A (M) U (M) G (M) U (F) U (M) A (M) C (M) C (M) A (M) GU (F) GU (F) A (M) G (M) U (M) C (M)) C (M) G (M) -1dT;

aptámero ID3:

GL2-400TS-C6-

C (M) C (M) G (M) A (M) U (M) A (M) C (M) U (F) A (M) G (M) G (M) GC (M) A (M) U (M) U (F) A (M) A (M) U (M) G (M) U (F) U (M) A (M) C (M) C (M) A (M) GU (F) GU (F) A (M) G (M) U (M) C (M)) G (M) G (M) -1dT;

aptámero ID4:

GL2-400TS-C6-

G (M) G (M) G (M) A (M) U (M) A (M) C (M) U (F) A (M) G (M) G (M) GC (M) G (M) U (M) U (F) A (M) A (M) C (M) G (M) U (F) U (M) A (M) C (M) C (M) A (M) GU (F) GU (F) A (M) G (M) U (M) C (M)) C (M) C (M) 1dT-;

5

aptámero ID5:

GL2-400TS-C6-

G (M) G (M) G (M) A (M) U (M) A (M) C (M) U (F) A (M) G (M) G (M) GC (M) A (M) U (M) U (F) U (M) A (M) U (M) G (M) U (F) U (M) A (M) C (M) C (M) A (M) GU (F) GU (F) A (M) G (M) U (M) C (M)) C (M) C (M) 1dT-; y

aptámero ID6:

1dT-

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

- 10 A partir de estos resultados, se aclara que otras preparaciones de aptámero de FGF2 preparadas usando una solución acuosa de manitol libre de electrolito también son estables.

Ejemplo comparativo 1 (Ensayo de estabilidad de la preparación de aptámero de FGF2)

- 15 El aptámero representado por el aptámero ID1 se disolvió en solución salina fisiológica o PBS hasta una concentración de 20 mg/ml para preparar preparaciones de aptámero de FGF2. Las preparaciones de aptámero de FGF2 obtenidas respectivamente se almacenaron durante 3 meses en diversas condiciones de temperatura que se muestran en la Tabla 3, y el porcentaje del contenido de monómero y la actividad de unión se midieron mediante cromatografía de exclusión por tamaño. Los resultados se muestran en la Tabla 3. A partir de los resultados, se aclaró que las preparaciones de aptámero de FGF2 preparadas usando solución salina fisiológica y PBS que contienen electrolito son inestables.

20

Tabla 3

Resultados del ensayo de estabilidad de preparaciones de aptámero de FGF2 preparadas usando una solución que contiene electrolito

concentración de la preparación (mg/mL)	solución	temperatura de almacenamiento	porcentaje de contenido de monómero (%)
20	solución salina psicológica	-20 °C	65,4
20	solución salina psicológica	5 °C	44,5
20	manitol al 3,3 %	-20 °C	68,2
20	manitol al 3,3 %	5 °C	36,8

Aplicabilidad industrial

- 5 La preparación de aptámero de la presente invención puede almacenar de manera estable un aptámero para FGF2 o una sal del mismo durante un largo plazo en forma de un líquido acuoso tal como inyección o similar mediante refrigeración. Por lo tanto, es extremadamente útil porque puede proporcionar una preparación con una mejor manipulación como agente terapéutico o profiláctico para enfermedades para las cuales la inhibición de FGF2 puede mostrar eficacia (por ejemplo, enfermedades acompañadas de angiogénesis tales como degeneración macular relacionada con la edad y similares, enfermedades de los huesos o cartílagos tales como osteoporosis, artritis reumatoide, osteoartritis, fracturas óseas y similares, dolor).
- 10

REIVINDICACIONES

1. Un líquido acuoso que comprende un aptámero o una sal del mismo que se une a FGF2, y un osmorregulador no electrolítico, en donde el aptámero o una sal del mismo es estable durante un largo plazo de manera que la proporción de un aptámero monómero después del almacenamiento de la preparación contenida en una botella de vidrio a 4 °C durante 3 meses no es inferior al 70 %, y en donde el osmorregulador es manitol.
2. El líquido acuoso según la reivindicación 1, en donde el líquido está sustancialmente libre de un electrolito distinto del aptámero o una sal del mismo.
3. El líquido acuoso según la reivindicación 1, en donde el aptámero comprende una secuencia de nucleótidos representada por la siguiente fórmula (1) (en donde el uracilo es opcionalmente timina):
$$N^1GGAN^2ACUAGGGCN^3UUAAN^4GUN^5ACCAGUGUN^6(1)$$
(en donde N¹ y N⁶ son cada uno independientemente cualquiera de 0 a varias bases, y N², N³, N⁴ y N⁵ son independientemente una base cualquiera), y es el siguiente (a) o (b):
(a) un aptámero en donde, en los nucleótidos contenidos en el aptámero,
(i) la posición 2' de la ribosa de cada nucleótido de pirimidina es un átomo de flúor,
(ii) la posición 2' de la ribosa de cada nucleótido de purina es un grupo hidroxilo;
(b) un aptámero en donde, en los nucleótidos contenidos en el aptámero,
(i) la posición 2' de la ribosa de cada nucleótido de pirimidina está independientemente no sustituida o sustituida por un átomo o grupo seleccionado del grupo que consiste en un átomo de hidrógeno, un grupo metoxi y un átomo de flúor,
(ii) la posición 2' de la ribosa de cada nucleótido de purina está independientemente no sustituida o sustituida por un átomo o grupo seleccionado del grupo que consiste en un átomo de hidrógeno, un grupo metoxi y un átomo de flúor.
4. El líquido acuoso según la reivindicación 1 o 2, en donde el aptámero comprende una secuencia de nucleótidos representada por la siguiente fórmula (3):
$$N^1GGAUACUAGGGCAUUAUGUUACCAGUGUAGUCN^{62}(3)$$
(en donde N¹ y N⁶² son cada uno independientemente cualquiera de 0 a varias bases).
5. El líquido acuoso según la reivindicación 1 o 2, en donde el aptámero comprende una secuencia de nucleótidos que se muestra en la SEQ ID NO: 3, 8, 9, 10 o 12.
6. El líquido acuoso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el aptámero tiene una concentración de 1-60 mg/ mL.
7. El líquido acuoso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el osmorregulador se mezcla en una proporción del 2-7,5 % (p/v) del líquido acuoso total.
8. El líquido acuoso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde el manitol está contenido a 1-50 mg por 1 mg del aptámero.
9. El líquido acuoso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde el líquido se almacena a no más de 5 °C.
10. El líquido acuoso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde una proporción de un aptámero monómero no es inferior al 80 % después del almacenamiento a 4 °C durante 3 meses.
11. El líquido acuoso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde el líquido es para inyección.
12. El líquido acuoso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 para su uso en la profilaxis o tratamiento de una enfermedad acompañada de angiogénesis, enfermedad de huesos o cartílagos o dolor.