



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) PI 0714844-5 A2



(22) Data de Depósito: 18/07/2007
(43) Data da Publicação: 26/11/2013
(RPI 2238)

(51) Int.Cl.:
C12N 15/11
A61K 38/00
C12Q 1/68

(54) Título: ÁCIDOS NUCLÉICOS LIGANDO A SDF-1 **(57) Resumo:**

(30) Prioridade Unionista: 18/07/2006 EP 06 014957.2

(73) Titular(es): Noxxon Pharma AG.

(72) Inventor(es): Christian Maasch, Dirk Eulberg, Florian Jarosch, Klaus Buchner, Nicole Dinse, Sven Klussmann, Werner Purschke

(74) Procurador(es): Dannemann , Siemsen, Bigler & Ipanema Moreira

(86) Pedido Internacional: PCT EP2007006387 de 18/07/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2008/009437de 24/01/2008

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**ÁCIDOS NUCLEÍCOS LIGANDO A SDF-1**".

A presente invenção se refere a ácidos nucleicos ligando ao fator 1 derivado de células estromais de quimocina CXC (SDF-1), e seu uso na fabricação de um medicamento, e seu uso na fabricação de um agente de diagnóstico.

As quimocinas são uma família de pequenas proteínas básicas de ligação de heparina, estruturalmente relacionadas, de 8 a 14 kDa. Funcionalmente, podem ser classificadas como pró-inflamatórias, homeostáticas, ou de dupla função (Moser, Wolf et al. 2004). Quimocinas inflamatórias são induzidas por patógenos, citocinas, ou fatores de crescimento e recrutam leucócitos efetores para sítios de infecção, inflamação, lesão tecidual, e tumor. As quimocinas referidas regulam o recrutamento, ativação, e proliferação de células brancas (leucócitos) (Schall and Bacon 1994; Springer 1995; Baggiolini 1998). Quimocinas induzem seletivamente quimiotaxia de neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monócitos, macrófagos, mastócitos, células T e células B. Além de seu efeito quimotático, podem exercer seletivamente outros efeitos em células responsivas como alterações no formato celular, aumento transitório na concentração de íons cálcio intracelular livre, desgranulação, regulação para cima de integrinas, formação de lipídeos bioativos (leucotrienos, prostaglandinas, tromboxanos), ou explosão respiratória (liberação de espécies de oxigênio reativo para destruição de organismos patogênicos ou células tumorais). Portanto, provocando a liberação de mediadores pró-inflamatórios adicionais, quimiotaxia e extravasamento de leucócitos em direção a sítios de infecção ou inflamação, quimocinas disparam aumento progressivo da reação inflamatória. Quimocinas homeostáticas, por outro lado, são expressadas predominantemente na medula óssea e nos tecidos linfóides e estão envolvidas na hematopoiese, vigilância imune, e reações imunes adaptativas (Godessart 2005).

Com base na disposição dos primeiros dois de quatro resíduos cisteína conservados, as quimocinas são divididas em quatro classes: CC ou β -quimocinas (por exemplo,) nas quais as cisteínas estão em tandem, CXC

ou α -quimocinas, onde são separadas por um resíduo aminoácido adicional, XC ou γ quimocinas (linfotactina/XCL1 como único representante até o momento) que possuem somente uma ponte dissulfeto, e CX3C-quimocinas as quais caracterizam três resíduos aminoácido entre as cisteínas (fractalcina ligada a membrana como único membro da classe; (Bazan, Bacon et al. 1997)).

As quimocinas CXC agem essencialmente sobre neutrófilos, em particular as quimocinas CXC que carregam a sequência de aminoácido ELR sobre seu término amino. Exemplos de quimocinas CXC que são ativas sobre neutrófilos são IL-8/CXCL8, $\text{GRO}\alpha$ /CXCL1, $\text{GRO}\beta$ /CXCL2, e $\text{GRO}\gamma$ /CXCL3, NAP-2/CXCL7, ENA-78/CXCL5, SDF-1/CXCL12 e GCP-2/CXCL6. As quimocinas CC agem sobre uma maior variedade de leucócitos, tais como monócitos, macrófagos, eosinófilos, basófilos, bem como linfócitos T e B (Oppenheim, Zachariae et al. 1991; Miller and Krangel 1992; Baggiolini, Dewald et al. 1994; Jose, Griffiths-Johnson et al. 1994; Ponath, Qin et al. 1996). Exemplos destas são I-309/CCL1; MCP-1/CCL2, MCP-2/CCL8, MCP-3/CCL7, MCP-4/CCL13, MIP-1 α /CCL3 e MIP-1 β /CCL4, RANTES/CCL5, e eotaxina/CCL11.

Quimocinas agem através de receptores que pertencem a uma superfamília de sete receptores acoplados a proteína G de transposição transmembrana (GPCRs; (Murphy, Baggiolini et al. 2000)). Falando de modo geral, interações de receptores de quimocina e quimocina tendem a ser promíscuas em que uma quimocina pode ligar muitos receptores de quimocina e de modo oposto um único receptor de quimocina pode interagir com várias quimocinas. Alguns receptores conhecidos para as quimocinas CXC incluem CXCR1, o qual liga $\text{GRO}\alpha$, GCP-2, e IL-8; CXCR2, o qual liga quimocinas incluindo $\text{GRO}\alpha$, $\text{GRO}\beta$, $\text{GRO}\gamma$, ENA-78, e IL-8; CXCR3, o qual liga quimocinas incluindo PF4, MIG, IP-10, e I-TAC; CXCR4 o qual até o momento foi visto que somente sinaliza em reação a SDF-1, e CXCR5, o qual foi demonstrado que sinaliza em reação a BCA-1 (Godessart 2005).

SDF-1 (fator derivado de células estromais-1; sinônimos, CXCL12; PBSF [fator estimulador do crescimento células pré-B]; TPAR-1 [gene

TPA reprimido 1]; SCYB12; TLSF [fator estimulador de células de linfoma tímico]; hIRH [intércrino humano reduzido em hepatomas]) é uma quimocina CXC angiogênica que não contém o motivo ELR típico das quimocinas semelhantes a IL-8 (Salcedo, Wasserman et al. 1999; Salcedo and Oppenheim
 5 2003) que liga e ativa o receptor CXCR4 acoplado a proteína G. A quimocina foi descoberta por três grupos independentemente, ou por clonagem de cDNAs que carregam seqüências de sinal de N-terminal (Tashiro, Tada et al. 1993), em virtude de sua capacidade para estimular progenitores de células B iniciais quando expressados pela linhagem de células estromais PA6
 10 (Nagasawa, Kikutani et al. 1994), ou por isolamento de uma biblioteca de cDNA construída a partir de fibroblastos de embrião de camundongo tratados com o ativador de proteína quinase C- tetra dodecanoil forbol acetato (TPA) (Jiang, Zhou et al. 1994).

Em consequência de junção alternativa, há duas formas de SDF-1, SDF-1 α (68 AA) e SDF-1 β , as quais carregam quatro resíduos adicionais no C-término (Shirozu, Nakano et al. 1995). A importância biológica destas duas variantes de junção não é completamente entendida.

A conservação de seqüência entre SDF-1 de diferentes espécies é notável: SDF-1 α humano (SEQ.ID. 1) e SDF-1 α murino (SEQ.ID. 2) são
 20 virtualmente idênticos. Há uma única uma alteração conservativa única de V para I na posição 18 (Shirozu, Nakano et al. 1995). Outra característica incomum que distingue SDF-1 da maioria das outras quimocinas é sua seletividade. De fato, SDF-1 e o receptor CXCR4 parecem compreender um par de receptor-ligante monógamo.

25 Existe um modelo de estrutura de NMR (acesso de PDB, 1SDF) para SDF-1 [8-68]. Foi visto que SDF-1 é um monômero com uma região de N-terminal desordenada. Foram encontradas diferenças com outras quimocinas principalmente no tamponamento do núcleo hidrofóbico e na distribuição de carga superficial (Crump, Gong et al. 1997).

30 Atividades fisiológicas de SDF-1: Como o receptor de SDF-1 CXCR4 é amplamente expressado sobre leucócitos, células dendríticas maduras, células endoteliais, células cerebrais, e megacariócitos, as atividades

de SDF-1 são pleiotrópicas. Esta quimocina, mais do que qualquer outra identificada até o momento, apresenta a faixa mais ampla de funções biológicas, especialmente fora do sistema imune. Os efeitos funcionais mais significativos de SDF-1 são:

5 *Homing e fixação* de células epiteliais a sítios neovasculares na porção coróide da retina. Foi demonstrado que SDF-1 está envolvido em homing de células epiteliais para a coróide durante neovascularização em tecido dos olhos. O papel exato destas células ainda está sob investigação mas a hipótese publicada é que células epiteliais estão envolvidas na formação de vasos sangüíneos aberrantes (Sengupta, Caballero et al. 2005).

10 *Hematopoiese.* SDF-1 é necessário para manter células progenitoras hematopoiéticas (CD34+) na medula óssea do adulto. AMD3100, um antagonista de CXCR4 seletivo, pode ser usado para mobilizar células CD34+ para transplantação de células-tronco hematopoiéticas. Células
15 CD34+ migram *in vitro* e *in vivo* em direção a um gradiente de SDF-1 produzido por células estromais (Aiuti, Webb et al. 1997).

Desenvolvimento e quimiotaxia de células B. SDF-1 suporta proliferação de células pré-B e aumenta o crescimento de progenitores de células B da medula óssea (Nagasawa, Kikutani et al. 1994); induz migração específica de células pré- e pré-B, enquanto não agindo como um quimioatratador significativo para células B maduras (D'Apuzzo, Rolink et al. 1997; Bleul, Schultze et al. 1998). Presumivelmente, SDF-1 é importante para o posicionamento de células B dentro de tecido linfóide secundário.

20 *Quimiotaxia de células T.* SDF-1 é um dos quimioatratores de células T mais eficazes; CXCR4 está presente em muitos subgrupos de células T (Bleul, Farzan et al. 1996).

Desenvolvimento embrionário. SDF-1 e seu receptor CXCR4 é essencial para o desenvolvimento embrionário. Camundongos de nocaute SDF-1 e CXCR4 morrem perinatalmente; eles apresentam defeitos do septo ventricular cardíaco ou desenvolvimento cerebelar anormal além de números
30 reduzidos de progenitores mielóides e de células B (Nagasawa, Hirota et al. 1996; Ma, Jones et al. 1998; Zou, Kottmann et al. 1998). SDF-1 também é

necessário para ontogenia normal do desenvolvimento sangüíneo durante a embriogênese (Juarez and Bendall 2004).

Infecção por HIV. SDF-1 tem capacidade de inibir a entrada de HIV-1 T-trópico em linhagens celulares portando CXCR4, e a expressão de SDF-1 pode ter um importante comportamento sobre a patogênese da AIDS, uma vez que um polimorfismo no gene de SDF-1 humano afeta o surto de AIDS (Bleul, Farzan et al. 1996).

Níveis de expressão alterados de SDF-1 ou seu receptor CXCR4 ou reações alteradas em direção a estas moléculas estão associadas com muitas doenças humanas, tais como retinopatia (Brooks, Caballero et al. 2004; Butler, Guthrie et al. 2005; Meleth, Agron et al. 2005); câncer de mama (Muller, Homey et al. 2001; Cabioglu, Sahin et al. 2005), ovários (Scotton, Wilson et al. 2002), pâncreas (Koshiba, Hosotani et al. 2000), tiróide (Hwang, Chung et al. 2003), nasofaringe (Wang, Wu et al. 2005); glioma (Zhou, Larsen et al. 2002); neuroblastoma (Geminder, Sagi-Assif et al. 2001); leucemia linfocítica crônica de células B (Burger, Tsukada et al. 2000); síndrome de WHIM (verrugas, hipogamaglobulinemia, infecções, mielocatexia) (Gulino, Moratto et al. 2004; Balabanian, Lagane et al. 2005; Kawai, Choi et al. 2005); síndromes de deficiência imunológica (Arya, Ginsberg et al. 1999; Marechal, Arenzana-Seisdedos et al. 1999; Soriano, Martinez et al. 2002); neovascularização patológica (Salvucci, Yao et al. 2002; Yamaguchi, Kusano et al. 2003; Grunewald, Avraham et al. 2006); inflamação (Murdoch 2000; Fedyk, Jones et al. 2001; Wang, Guan et al. 2001); esclerose múltipla (Krumbholz, Theil et al. 2006); artrite reumatóide / osteoartrite (Buckley, Amft et al. 2000; Kanbe, Takagishi et al. 2002; Grassi, Cristino et al. 2004).

Em situações de animais experimentais, antagonistas de SDF-1 ou seu receptor se comprovaram eficientes para bloqueio do crescimento e/ou disseminação metastática de células de câncer humano de diferentes origens tais como pâncreas (Guleng, Tateishi et al. 2005; Saur, Seidler et al. 2005), cólon (Zeelenberg, Ruuls-Van Stalle et al. 2003; Guleng, Tateishi et al. 2005), mama (Muller, Homey et al. 2001; Lapteva, Yang et al. 2005), pulmão (Phillips, Burdick et al. 2003), glioblastoma / meduloblastoma (Rubin,

Kung et al. 2003), próstata (Sun, Schneider et al. 2005), osteossarcoma (Perissinotto, Cavalloni et al. 2005), melanoma (Takenaga, Tamamura et al. 2004), estômago (Yasumoto, Koizumi et al. 2006), mieloma múltiplo (Menu, Asosingh et al. 2006).

5 Além disso, terapia anti-SDF-1 foi benéfica em modelos animais para prevenir neovascularização retinal (Butler, Guthrie et al. 2005), nefrite (Balabanian, Couderc et al. 2003) e artrite (Matthys, Hatse et al. 2001; Tamamura, Fujisawa et al. 2004; De Klerck, Geboes et al. 2005).

10 SDF-1 é um agente na patologia de doenças do fundo de olho tais como retinopatia diabética (DR) (Fong, Aiello et al. 2004) e degeneração macular relacionada com a idade (AMD) (Ambati, Anand et al. 2003). Ambas estas doenças danificam o olho e levam a perda gradual da visão culminando em cegueira. A lesão ocorre devido ao crescimento inadequado de vasos sangüíneos no fundo do olho, um processo conhecido como neovascularização coroidal (CNV). Durante a neovascularização coroidal, novos vasos sangüíneos que se originam da coróide migram através de um rompimento na membrana de Bruch para dentro do epitélio do pigmento sub-retinal (sub-RPE) ou espaço subretinal. Os vasos anormais podem sangrar (hemorragia intrarretinal) ou vaziar fluido sobre a retina. Isto pode deixar cicatrizes e pode elevar a mácula, o que distorce a visão.

20 Imagina-se que o SDF-1 tenha um papel na neovascularização coroidal através do recrutamento de células precursoras endoteliais (EPCs) para o olho. Estas células precursoras então se tornam componentes estruturais chave nos vasos sangüíneos aberrantes.

25 Retinopatia diabética é uma seqüela importante do diabetes, ocorrendo freqüentemente em pacientes tanto com diabetes tipo 1 quanto com tipo 2. Há aproximadamente 16 milhões de diabéticos nos Estados Unidos, com quase 8 milhões tendo alguma forma de retinopatia diabética. Quando a retinopatia diabética proliferativa (PDR) é deixada sem tratamento, 30 cerca de 60% dos pacientes se tornam cegos em um ou ambos os olhos dentro de 5 anos. Com o aumento alarmante na prevalência de diabetes na América do Norte, Europa e muitos países emergentes, a população de pa-

cientes está crescendo rapidamente. Por exemplo, a incidência de cegueira é 25 vezes maior em pacientes com diabetes do que na população geral. Além disso, a retinopatia diabética (DR) é a causa mais comum de cegueira em indivíduos da meia idade, sendo responsável por no mínimo 12 por cento de todos os novos casos nos Estados Unidos a cada ano. Programas de triagem estão sendo realizados de modo que a visão de pacientes com diabetes possa ser monitorada e que o tratamento possa ser liberado em tempo, tal como está disponível.

As causas diretas de retinopatia diabética são parcamente entendidas, mas imagina-se que a doença tenha suas origens em uma combinação de fontes: auto-regulação prejudicada do fluxo sangüíneo da retina; acumulação de sorbitol dentro das células da retina; e acumulação de produtos finais de glicosilação avançada no fluido extracelular. Todos estes fatores estão relacionados diretamente ou indiretamente com hiperglicemia, a abundância de açúcar na corrente sangüínea.

Os sintomas de retinopatia diabética são similares aos da degeneração macular relacionada com a idade. Os pacientes perdem células na retina e ocorrem microaneurismas (escoamentos de sangue) na membrana de base da retina. Além disso, VEGF, IGF-1 e outros fatores transportados pelo sangue, possivelmente incluindo SDF-1, atraem novas células vasculares e estimulam a formação de vasos sangüíneos prejudiciais.

Degeneração macular relacionada com a idade (AMD) destrói a visão central de uma pessoa. Os estágios iniciais da doença podem mesmo não ser dignos de nota, porque os sintomas variam entre os pacientes. Algumas vezes um paciente é afetado somente em um olho. Ou a visão pode ser prejudicada em ambos os olhos mas não significativamente. A doença causa distorção ou percepção defeituosa das cores. Freqüentemente há um ponto escuro no centro do campo visual.

A etiologia (curso) da doença é parcamente compreendida. Freqüentemente a degeneração macular relacionada com a idade é considerada como o envelhecimento da camada mais externa da retina. As alterações físicas ocorrem no centro da retina, também conhecida como a mácula, a

qual é a parte da retina responsável pela visão mais aguda.

Degeneração macular relacionada com a idade úmida se inicia como uma seqüela para a forma seca da doença. Uns 90% dos pacientes sofrem da forma seca de degeneração macular relacionada com a idade, o
5 que resulta no adelgaçamento de tecidos maculares e distúrbios em sua pigmentação. O resto tem a forma úmida, a qual envolve a hemorragia descrita acima.

A forma úmida de degeneração macular relacionada com a idade representa um mercado ideal para um novo terapêutico: já a causa mais
10 comum de cegueira em pessoas acima da idade de 55, a degeneração macular relacionada com a idade afeta uma estimativa de 4% a 5% da população dos Estados Unidos com idades de 65 a 74 e quase 10% daqueles com 75 anos de idade ou mais. Já há 5 milhões de pessoas nos Estados Unidos somente acima da idade de 80 que têm esta doença e espera-se que outros
15 5 milhões de pessoas sejam afetadas por volta de 2020.

Tumores não são somente massas de células cancerígenas: infiltração de tumores com células imunes é uma característica do câncer. Muitos cânceres humanos têm uma rede complexa de quimocina que influencia a extensão e o fenótipo deste infiltrado, bem como crescimento, so-
20 brevida e migração tumorais, e angiogênese. A maior parte dos tumores sólidos contém muitas células estromais não-malignas. Na verdade, as células estromais algumas vezes superam em número as células cancerígenas. As células estromais predominantes que são encontradas em cânceres são macrófagos, linfócitos, células endoteliais e fibroblastos.

Células malignas de diferentes tipos de câncer têm diferentes perfis de expressão de receptor de quimocina, mas o receptor de SDF-1 CXCR4 é o mais comumente encontrado em camundongo e no homem: cé-
25 lulas tumorais de no mínimo 23 tipos diferentes de cânceres humanos de origem epitelial, mesenquimal, e hematopoiética expressam CXCR4 (Balkwill 2004). SDF-1 é o único ligante conhecido para CXCR4. À parte da medula óssea e de tecido linfóide secundário, onde é expressado constitutivamente,
30 SDF-1 é encontrado em sítios tumorais primários em linfoma (Corcione, Ot-

tonello et al. 2000) e tumores cerebrais tanto de linhagem neuronal quanto astrocítica. Além disso, está presente em alguns níveis em câncer de ovário (Scotton, Wilson et al. 2002) e câncer pancreático (Koshiba, Hosotani et al. 2000) bem como em sítios de metástase em câncer de mama (Muller, Homey et al. 2001) e da tireóide (Hwang, Chung et al. 2003), neuroblastoma e malignidades hematológicas (Geminder, Sagi-Assif et al. 2001). Em contraste, a expressão de CXCR4 é baixa ou está ausente sobre epitélios normais de mama (Muller, Homey et al. 2001), de ovário (Scotton, Wilson et al. 2002) e de próstata (Sun, Schneider et al. 2005). A expressão de CXCR4 portanto parece ser uma característica geral da célula epitelial maligna e não seu complemento normal.

Inibição da sinalização de receptor de quimocina sobre células tumorais tem o potencial de induzir parada do crescimento ou apoptose, e evitar invasão e metástase *in vivo*:

Knockdown de CXCR4 por siRNA anulou o crescimento de tumor de mama (Lapteva, Yang et al. 2005); células de hibridoma T as quais foram transfectadas com um constructo que previne a expressão superficial de CXCR4 não podem mais metastizar para órgãos distantes quando injetadas por via intravenosa em camundongos (Zeelenberg, Ruuls-Van Stalle et al. 2001); em experimentos similares com células de câncer colorretal, metástases de pulmão e de fígado foram muito reduzidas (Zeelenberg, Ruuls-Van Stalle et al. 2003); anticorpos anti-CXCR4 inibiram a disseminação de xenoenxertos de câncer de mama para os linfonodos (Muller, Homey et al. 2001); tratamento de células linfoblastóides com anticorpos anti-CXCR4 ou anti-SDF-1 retardou o crescimento tumoral em camundongos (NOD)/SCID (Bertolini, Dell'Agnola et al. 2002); anticorpos anti-SDF-1 inibiram o desenvolvimento de metástases de órgãos de células de câncer pulmonar de células não pequenas (NSCLC) (Phillips, Burdick et al. 2003); administração sistêmica do CXCR4 antagonista AMD3100 (AnorMED) inibiu o crescimento de glioblastoma intracranial e xenoenxertos de meduloblastoma, e aumento de apoptose de células tumorais dentro de 24 horas (Rubin, Kung et al. 2003); anticorpos anti-SDF-1 inibiram o crescimento de células de câncer de mama

MCF-7 misturadas com fibroblastos associados a carcinoma (Orimo, Gupta et al. 2005); neutralização de CXCR4 com anticorpos bloqueou metástase de câncer de próstata e crescimento em sítios ósseos (Sun, Schneider et al. 2005); desenvolvimento de metástase pulmonar depois de injeção de células de osteossarcoma foi evitado por administração do CXCR4 antagonista peptídico T134 (Perissinotto, Cavalloni et al. 2005).

Diferentes autores chegam à conclusão de que tendo por alvo o eixo SDF-1 / CXCR4 pode proporcionar novas opções terapêuticas para pacientes com câncer:

Tumores de ovário humano expressam fortemente SDF-1 mais, em um menor nível, VEGF. Ambas as proteínas são disparadas por hipoxia no tumor. Concentrações patológicas de quaisquer das proteínas somente não foram suficientes para induzir angiogênese in vivo, mas juntos, SDF-1 e VEGF em concentrações patológicas induziram de modo eficaz e sinergicamente neovascularização. Portanto, interromper este eixo sinérgico, ao invés de VEGF somente, pode ser uma nova estratégia antiangiogênese eficaz para tratar câncer (Kryczek, Lange et al. 2005);

Linhagens de células de câncer de mama, quando equipadas com o caminho de sinalização SDF-1 / CXCR4 autócrino, apresentam comportamento agressivo. Isto inclui um aumento na invasividade e migração junto com crescimento mais rápido. O eixo SDF-1 / CXCR4 pode portanto proporcionar importante informação para prognosticar a natureza agressiva e constituir importantes alvos terapêuticos em câncer de mama humano (Kang, Watkins et al. 2005);

A migração e a metástase de células de câncer pulmonar de células pequenas (SCLC) – as quais expressam altos níveis de CXCR4 – são reguladas pelo SDF-1. A ativação de CXCR4 promove adesão a células acessórias (tais como células estromais) e moléculas da matriz extracelular dentro do microambiente tumoral. Estas interações adesivas resultam em uma aumentada resistência de células de câncer pulmonar de células pequenas a quimioterapia. Deste modo, inibidores do eixo SDF-1 / CXCR4 podem aumentar a quimiossensibilidade de células de câncer pulmonar de cé-

lulas pequenas e levar a novos caminhos terapêuticos para pacientes com câncer pulmonar de células pequenas (Hartmann, Burger et al. 2004);

O eixo SDF-1 / CXCR4 surge como um regulador pivotal do tráfico de vários tipos de células-tronco no corpo. Como a maioria caso não
5 todas as malignidades se originam no compartimento de células-tronco / células progenitoras, as células-tronco cancerígenas também expressam CXCR4 sobre sua superfície e, em consequência, o eixo SDF-1 / CXCR4 está envolvido em direcionar seu tráfico / sua metástase para órgãos que expres-
sam SDF-1 (por exemplo, linfonodos, pulmões, fígado, ossos). Em conse-
10 quência, estratégias tendo por alvo a modulação do eixo SDF-1 / CXCR4 pode ter importantes aplicações clínicas tanto em medicina regenerativa para liberar células-tronco normais para os tecidos quanto em oncologia clínica para inibir metástase de células-tronco cancerígenas (Kucia, Reca et al. 2005).

15 O problema básico da presente invenção é proporcionar um antagonista específico para SDF-1. Um aspecto adicional do problema básico da presente invenção é proporcionar um composto para o tratamento de doenças e distúrbios envolvendo SDF-1 e o CXCR4 receptor, respectivamente.

Um outro problema básico da presente invenção é proporcionar
20 métodos para a detecção específica de SDF-1.

O problema básico da presente invenção é resolvido pelo tema das reivindicações independentes. Modalidades preferenciais podem ser tiradas das reivindicações dependentes.

Em um primeiro aspecto o problema básico da presente inven-
25 ção é resolvido por uma molécula de ácido nucléico, preferencialmente ligando a SDF-1, selecionada entre o grupo compreendendo moléculas de ácido nucléico tipo A, moléculas de ácido nucléico tipo B, moléculas de ácido nucléico tipo C e moléculas de ácido nucléico tendo uma sequência de ácido nucléico de acordo com qualquer de SEQ. ID. No. 142, SEQ. ID. No. 143 e
30 SEQ. ID. No. 144.

Em uma modalidade as moléculas de ácido nucléico tipo A compreendem a seguinte sequência de nucleotídeos de núcleo:

5' AAAGYRACAHGUMAAX_AUGAAAGGUARC 3' (SEQ.ID. 19)

por meio da qual X_A ou está ausente ou é A.

Em uma modalidade preferencial as moléculas de ácido nucléico tipo A compreendem uma seqüência de nucleotídeos de núcleo selecionada entre o grupo compreendendo

5

5' AAAGYRACAHGUMAAUGAAAGGUARC 3' (SEQ. ID. No. 20),

5' AAAGYRACAHGUMAAAUGAAAGGUARC 3' (SEQ. ID. No. 21), e

10 5' AAAGYAACAAGUCAUGAAAGGUARC 3' (SEQ. ID. No. 22), preferencialmente a seqüência de nucleotídeos de núcleo compreende 5' AAAGYAACAAGUCAUGAAAGGUARC 3' (SEQ. ID. No. 22).

Em uma modalidade a molécula de ácido nucléico compreende na direção 5'→3' um primeiro trecho de nucleotídeos, a seqüência de nucleotídeos de núcleo, e um segundo trecho de nucleotídeos.

15

Em uma modalidade a molécula de ácido nucléico compreende na direção 5'→3' um segundo trecho de nucleotídeos, a seqüência de nucleotídeos de núcleo, e um primeiro trecho de nucleotídeos.

Em uma modalidade preferencial a molécula de ácido nucléico compreende o primeiro e o segundo trecho de nucleotídeos e o referido primeiro e o referido segundo trecho de nucleotídeos opcionalmente hibridizam um com o outro, por meio da qual na hibridização se forma uma estrutura de filamento duplo.

Em uma modalidade preferencial adicional a estrutura de filamento duplo consiste de quatro a seis pares de bases, preferencialmente cinco pares de bases.

25

Em uma modalidade o primeiro trecho de nucleotídeos compreende uma seqüência de nucleotídeos de 5' X₁X₂NNBV 3' (SEQ. ID. No. 44) e o segundo trecho de nucleotídeos compreende uma seqüência de nucleotídeos de 5' BNBX₃X₄ 3' (SEQ. ID. No. 45)

30

por meio da qual X₁ ou está ausente ou R, X₂ é S, X₃ é S e X₄ ou está ausente ou Y;

ou

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

Em uma modalidade o primeiro trecho de nucleotídeos compreende uma seqüência de nucleotídeos de 5' RSHRYR 3' (SEQ. ID. No. 23) e o segundo trecho de nucleotídeos compreende uma seqüência de nucleotídeos de 5' YRYDSY 3' (SEQ. ID. No. 24),

preferencialmente o primeiro trecho de nucleotídeos compreende uma seqüência de nucleotídeos de 5' GCUGUG 3' e o segundo trecho de nucleotídeos compreende uma seqüência de nucleotídeos de 5' CGCAGC 3'.

Em uma modalidade o primeiro trecho de nucleotídeos compreende uma seqüência de nucleotídeos de 5' X_2 BBBS 3' (SEQ. ID. No. 42) e o segundo trecho de nucleotídeos compreende uma seqüência de nucleotídeos de 5' SBBV X_3 3' (SEQ. ID. No. 43),

por meio da qual X_2 ou está ausente ou é S e X_3 ou está ausente ou é S;

preferencialmente o primeiro trecho de nucleotídeos compreende uma seqüência de nucleotídeos de 5' CUGUG 3' e o segundo trecho de nucleotídeos compreende uma seqüência de nucleotídeos de 5' CGCAG 3';

ou o primeiro trecho de nucleotídeos compreende uma seqüência de nucleotídeos de 5' GCGUG 3' e o segundo trecho de nucleotídeos compreende uma seqüência de nucleotídeos de 5' CGCGC 3'.

Em uma modalidade a molécula de ácido nucléico tem uma seqüência de ácido nucléico de acordo com quaisquer das SEQ. ID. Nos. 5 a 18, 25 a 41, 133, 137, 139 a 141.

Em uma modalidade as moléculas de ácido nucléico tipo B compreendem a seguinte seqüência de nucleotídeos de núcleo:

5' GUGUGAUCUAGAUGUADWGGCUGWUCCUAGUYAGG 3' (SEQ. ID. No. 57).

Em uma modalidade preferencial as moléculas de ácido nucléico tipo B compreendem uma seqüência de nucleotídeos de núcleo de GUGU-

GAUCUAGAUGUADUGGCUGAUCCUAGUCAGG (SEQ. ID. No. 58):

Em uma modalidade a molécula de ácido nucléico compreende na direção 5'→3' um primeiro trecho de nucleotídeos, a seqüência de nucleotídeos de núcleo, e um segundo trecho de nucleotídeos.

5 Em uma modalidade a molécula de ácido nucléico compreende na direção 5'→3' um segundo trecho de nucleotídeos, a seqüência de nucleotídeos de núcleo, e um primeiro trecho de nucleotídeos

Em uma modalidade preferencial a molécula de ácido nucléico compreende o primeiro e o segundo trecho de nucleotídeos e o referido primeiro e o referido segundo trecho de nucleotídeos opcionalmente hibridizam um com o outro, por meio da qual na hibridização se forma uma estrutura de filamento duplo.

Em uma modalidade a estrutura de filamento duplo consiste de quatro a seis pares de bases, preferencialmente cinco pares de bases.

15 Em uma modalidade o primeiro trecho de nucleotídeos compreende uma seqüência de nucleotídeos de 5' X₁X₂SVNS 3' (SEQ. ID. No. 77) e o segundo trecho de nucleotídeos compreende uma seqüência de nucleotídeos de 5' BVBSX₃X₄ 3' (SEQ. ID. No. 78), por meio da qual

X₁ ou está ausente ou é A, X₂ é G, X₃ é C e X₄ ou está ausente
20 ou é U;
ou

X₁ está ausente, X₂ ou está ausente ou é G, X₃ ou está ausente ou é C e X₄ está ausente.

Em uma modalidade o primeiro trecho de nucleotídeos compreende uma seqüência de nucleotídeos de 5' X₁GCRWG 3' (SEQ. ID. No. 59) e o segundo trecho de nucleotídeos compreende uma seqüência de nucleotídeos de 5' KRYSCX₄ 3' (SEQ. ID. No. 60),

por meio da qual X₁ ou está ausente ou é A, e X₄ ou está ausente ou é U.

30 Em uma modalidade o primeiro trecho de nucleotídeos compreende uma seqüência de nucleotídeos de 5' X₁GCGUG 3' (SEQ. ID. No. 75) e o segundo trecho de nucleotídeos compreende uma seqüência de nucleotí-

deos de 5' UACGCX₄ 3' (SEQ. ID. No. 76),

por meio da qual X₁ ou está ausente ou é A, e X₄ ou está ausente ou é U,

preferencialmente o primeiro trecho de nucleotídeos compreende uma seqüência de nucleotídeos de 5' AGCGUG 3' e o segundo trecho de nucleotídeos compreende uma seqüência de nucleotídeos de 5' UACGCU 3'.

Em uma modalidade o primeiro trecho de nucleotídeos compreende uma seqüência de nucleotídeos de 5' X₂SSBS 3' (SEQ. ID. No. 73) e o segundo trecho de nucleotídeos compreende uma seqüência de nucleotídeos de 5' BVSSX₃ 3' (SEQ. ID. No. 74),

por meio da qual X₂ ou está ausente ou G, e X₃ ou está ausente ou C,

preferencialmente o primeiro trecho de nucleotídeos compreende uma seqüência de nucleotídeos de 5' GCGUG 3' e o segundo trecho de nucleotídeos compreende uma seqüência de nucleotídeos de 5' UACGC 3'.

Em uma modalidade a molécula de ácido nucléico tem uma seqüência de ácido nucléico de acordo com quaisquer das SEQ. ID. Nos. 46 a 56, 61 a 72, 132.

Em uma modalidade as moléculas de ácido nucléico tipo C compreendem uma seqüência de nucleotídeos de núcleo de GGUYAGGGCU-HRX_AAGUCGG (SEQ. ID. No. 90),

por meio da qual X_A ou está ausente ou é A.

Em uma modalidade preferencial as moléculas de ácido nucléico tipo C compreendem uma seqüência de nucleotídeos de núcleo selecionada entre o grupo compreendendo

5' GGUYAGGGCUHRAAGUCGG 3' (SEQ. ID. No. 91),

5' GGUYAGGGCUHRAGUCGG 3' (SEQ. ID. No. 92), e

5' GGUUAGGGCUHGAAGUCGG 3' (SEQ. ID. No. 93), preferencialmente a seqüência de nucleotídeos de núcleo compreende 5' GGUU-AGGGCUHGAAGUCGG 3' (SEQ. ID. No. 93).

Em uma modalidade a molécula de ácido nucléico compreende

na direção 5'→3' um primeiro trecho de nucleotídeos, a seqüência de nucleotídeos de núcleo, e um segundo trecho de nucleotídeos.

Em uma modalidade a molécula de ácido nucléico compreende na direção 5'→3' um segundo trecho de nucleotídeos, a seqüência de nucleotídeos de núcleo, e um primeiro trecho de nucleotídeos.

Em uma modalidade preferencial a molécula de ácido nucléico compreende o primeiro e o segundo trecho de nucleotídeos e por meio da qual no mínimo uma parte do referido primeiro trecho e no mínimo uma parte do referido segundo trecho de nucleotídeos opcionalmente hibridizam um com o outro, por meio da qual na hibridização se forma uma estrutura de filamento duplo.

Em uma modalidade a extensão do primeiro trecho e a extensão do segundo trecho é individualmente e independentemente 0 a 17 nucleotídeos, preferencialmente 4 a 10 nucleotídeos e mais preferencialmente 4 a 6 nucleotídeos.

Em uma modalidade a estrutura de filamento duplo compreende 4 a 10 pares de bases, preferencialmente 4 a 6 pares de bases, mais preferencialmente 5 pares de bases.

Em uma modalidade preferencial a estrutura de filamento duplo compreende 4 a 10 pares de bases consecutivos, preferencialmente 4 a 6 pares de bases consecutivos, mais preferencialmente 5 pares de bases consecutivos.

Em uma modalidade o primeiro trecho de nucleotídeos compreende uma seqüência de nucleotídeos de 5' RKSBUSNVGR 3' (SEQ. ID. No. 120) e o segundo trecho de nucleotídeos compreende uma seqüência de nucleotídeos de 5' YYNRCASSMY 3' (SEQ. ID. No. 121),

preferencialmente o primeiro trecho de nucleotídeos compreende uma seqüência de nucleotídeos de 5' RKSBUGSVGR 3' (SEQ. ID. No. 122) e o segundo trecho de nucleotídeos compreende uma seqüência de nucleotídeos de 5' YCNRCASSMY 3' (SEQ. ID. No. 123).

Em uma modalidade o primeiro trecho de nucleotídeos compreende uma seqüência de nucleotídeos de 5' X₅SSSV 3' (SEQ. ID. No. 124) e

o segundo trecho de nucleotídeos compreende uma seqüência de nucleotídeos de 5' BSSSX_S 3' (SEQ. ID. No. 125), por meio da qual X_S ou está ausente ou é S.

Em uma modalidade o primeiro trecho de nucleotídeos compreende uma seqüência de nucleotídeos de 5' SSSSR 3' (SEQ. ID. No. 130) e o segundo trecho de nucleotídeos compreende uma seqüência de nucleotídeos de 5' YSBSS 3' (SEQ. ID. No. 131),

preferencialmente o primeiro trecho de nucleotídeos compreende uma seqüência de nucleotídeos de 5' SGGSR 3' (SEQ. ID. No. 126) e o segundo trecho de nucleotídeos compreende uma seqüência de nucleotídeos de 5' YSCCS 3' (SEQ. ID. No. 127).

Em uma modalidade o primeiro trecho de nucleotídeos compreende uma seqüência de nucleotídeos de 5' GCSGG 3' (SEQ. ID. No. 128) e o segundo trecho de nucleotídeos compreende uma seqüência de nucleotídeos de 5' CCKGC 3' (SEQ. ID. No. 129),

preferencialmente o primeiro trecho de nucleotídeos compreende uma seqüência de nucleotídeos de 5' GCCGG 3' e o segundo trecho de nucleotídeos compreende uma seqüência de nucleotídeos de 5' CCGGC 3'.

Em uma modalidade o primeiro trecho de nucleotídeos compreende uma seqüência de nucleotídeos de 5' CGUGCGCUUGAGAUAGG 3' e o segundo trecho de nucleotídeos compreende uma seqüência de nucleotídeos de 5' CUGAUUCUCACG 3'.

Em uma modalidade o primeiro trecho de nucleotídeos compreende uma seqüência de nucleotídeos de 5' UGAGAUAGG 3' e o segundo trecho de nucleotídeos compreende uma seqüência de nucleotídeos de 5' CUGAUUCUCA 3'.

Em uma modalidade o primeiro trecho de nucleotídeos compreende uma seqüência de nucleotídeos de 5' GAGAUAGG 3' e o segundo trecho de nucleotídeos compreende uma seqüência de nucleotídeos de 5' CUGAUUCUC 3'.

Em uma modalidade a molécula de ácido nucléico tem uma seqüência de ácido nucléico de acordo com quaisquer das SEQ. ID. Nos. 79 a

89, 94 a 119, 134 a 136.

Em uma modalidade a molécula de ácido nucléico tem uma sequência de ácido nucléico de acordo com quaisquer das SEQ. ID. Nos. 142 a 144.

5 Em uma modalidade a molécula de ácido nucléico é um antagonista para SDF-1.

Em uma modalidade a molécula de ácido nucléico é um antagonista do sistema receptor de SDF-1, preferencialmente o receptor de SDF-1 do sistema receptor de SDF-1 é o CXCR4 receptor.

10 Em uma modalidade o SDF-1 é um SDF-1 humano e/ou o receptor de SDF-1 é um receptor de SDF-1 humano.

Em uma modalidade SDF-1 compreende uma sequência de aminoácido de acordo com a SEQ ID No. 1.

15 Em uma modalidade o ácido nucléico compreende uma modificação.

Em uma modalidade preferencial a modificação é selecionada entre o grupo compreendendo uma porção HES e uma porção PEG.

Em uma modalidade preferencial adicional a modificação é uma porção PEG consistindo de um PEG reto ou ramificado, por meio da qual o peso molecular da porção PEG é preferencialmente a partir de cerca de 2 até 180 kD, mais preferencialmente a partir de cerca de 60 até 140 kD e o mais preferencialmente cerca de 40 kD.

20 Em uma modalidade a modificação é uma porção HES, por meio da qual preferencialmente o peso molecular da porção HES é a partir de cerca de 10 até 130 kD, mais preferencialmente a partir de cerca de 30 até 130 kD e o mais preferencialmente cerca de 100 kD.

Em uma modalidade os nucleotídeos do ácido nucléico são L-nucleotídeos, preferencialmente os nucleotídeos das seqüências de acordo com quaisquer das SEQ. ID. Nos.: 19, 20, 21, 22, 57, 58, 90, 91, 92, e 93.

30 Em um segundo aspecto o problema básico da presente invenção é resolvido por uma composição farmacêutica compreendendo um ácido nucléico de acordo com o primeiro aspecto e opcionalmente um constituinte

adicional, por meio da qual o constituinte adicional é selecionado entre o grupo compreendendo excipientes farmacologicamente aceitáveis e agentes farmacologicamente ativos.

5 Em um terceiro aspecto o problema básico da presente invenção é resolvido pelo uso de um ácido nucléico de acordo com o primeiro aspecto para a fabricação de um medicamento.

10 Em uma modalidade do terceiro aspecto o medicamento é para o tratamento e/ou prevenção de uma doença ou distúrbio, por meio do qual semelhante doença ou distúrbio é mediado por SDF-1, preferencialmente semelhante doença ou distúrbio é selecionado entre o grupo compreendendo doenças do fundo de olho como retinopatia diabética e degeneração macular relacionada com a idade; câncer de mama, ovários, próstata, pâncreas, tireóide, nasofaringe, cólon, pulmão, e estômago; osteossarcoma; melanoma; glioma; medulo- e neuroblastoma; leucemia; síndrome de WHIM; síndromes de deficiência imunológica; neovascularização patológica; inflamação; esclerose múltipla; artrite reumatóide / osteoartrite e nefrite.

15 Em uma modalidade do terceiro aspecto o medicamento é para inibir angiogênese, neovascularização, inflamação e metástase.

20 Em um quarto aspecto o problema básico da presente invenção é resolvido pelo uso do ácido nucléico de acordo com o primeiro aspecto para a fabricação de um meio diagnóstico.

25 Em uma modalidade do quarto aspecto o meio diagnóstico é para o diagnóstico de uma doença, por meio do qual a doença é selecionada entre o grupo compreendendo doenças do fundo de olho como retinopatia diabética e degeneração macular relacionada com a idade; câncer de mama, ovários, próstata, pâncreas, tireóide, nasofaringe, cólon, pulmão, e estômago; osteossarcoma; melanoma; glioma; medulo- e neuroblastoma; leucemia; síndrome de WHIM; síndromes de deficiência imunológica; neovascularização patológica; inflamação; esclerose múltipla; artrite reumatóide / osteoartrite e nefrite.

30 Em uma modalidade do quarto aspecto o meio diagnóstico é para diagnosticar angiogênese, neovascularização, inflamação e/ou metástase.

Em um quinto aspecto o problema básico da presente invenção é resolvido por um complexo compreendendo SDF-1 e um ácido nucléico de acordo com o primeiro aspecto, por meio da qual preferencialmente o complexo é um complexo cristalino.

5 Em um sexto aspecto o problema básico da presente invenção é resolvido pelo uso do ácido nucléico de acordo com o primeiro aspecto para a detecção de SDF-1.

 Em um sétimo aspecto o problema básico da presente invenção é resolvido por um método para a triagem de um antagonista de SDF-1 ou
10 um SDF-1 agonista compreendendo as seguintes etapas:

 proporcionar um antagonista de SDF-1 candidato e/ou um SDF-1 agonista candidato,

 - proporcionar um ácido nucléico de acordo com o primeiro aspecto,

15 - proporcionar um sistema de teste o qual proporciona um sinal na presença de um antagonista de SDF-1 e/ou um SDF-1 agonista, e

 - determinar se o antagonista de SDF-1 candidato é um antagonista de SDF-1 e/ou whether o SDF-1 agonista candidato é um SDF-1 agonista.

20 Em um oitavo aspecto o problema básico da presente invenção é resolvido por um método para a triagem de um SDF-1 agonista e/ou um antagonista de SDF-1 compreende as seguintes etapas:

 - proporcionar SDF-1 imobilizado para uma fase, preferencialmente uma fase sólida,

25 - proporcionar um ácido nucléico de acordo com o primeiro aspecto, preferencialmente um ácido nucléico de acordo com o primeiro aspecto o qual é marcado,

 - adicionar um SDF-1 agonista candidato e/ou um antagonista de SDF-1 candidato, e

30 - determinar se o SDF-1 agonista candidato é um SDF-1 agonista e/ou se o antagonista de SDF-1 candidato é um antagonista de SDF-1.

 Em uma modalidade do oitavo aspecto a determinação é reali-

zada de tal modo que é avaliado se o ácido nucléico é substituído pelo SDF-1 agonista candidato ou por um antagonista de SDF-1 candidato.

Em um nono aspecto o problema básico da presente invenção é resolvido por um kit para a detecção de SDF-1, compreendendo um ácido nucléico de acordo com o primeiro aspecto.

Em um décimo aspecto o problema básico da presente invenção é resolvido por um antagonista de SDF-1 obténível pelo método de acordo com o sétimo aspecto ou o oitavo aspecto.

A presente invenção se baseia no achado surpreendente que é possível gerar ácidos nucléicos ligando especificamente e com alta afinidade a SDF-1.

SDF-1 é um peptídeo básico tendo a seqüência de aminoácido de acordo com a SEQ. ID. No. 1. O pI calculado de SDF-1 é 9,70. Conforme usado aqui, neste requerimento de patente, o termo SDF-1 se refere a qualquer SDF-1 incluindo, mas não limitado a, SDF-1 mamífero. Preferencialmente, o SDF-1 mamífero é selecionado entre o grupo compreendendo SDF-1 de camundongos, de rato, de coelho, de hamster, de macaco e humano. O mais preferencialmente o SDF-1 é SDF-1 humano (SEQ.ID. 1).

A descoberta de que ácidos nucléicos ligando com alta afinidade a SDF-1 podem ser identificados, é *insofar* surpreendente conforme Eaton et al. (Eaton, Gold et al. 1997) observaram que a produção de aptâmeros, isto é, D-ácidos nucléicos ligando a uma molécula alvo, dirigida para uma proteína básica é em geral muito difícil porque este tipo de alvo produz uma proporção de sinal para ruído elevada mas não específica. Esta elevada proporção de sinal para ruído resulta da elevada afinidade não específica mostrada por ácidos nucléicos para alvos básicos tais como SDF-1.

As características do ácido nucléico de acordo com a presente invenção conforme descrito aqui, neste requerimento de patente, podem ser realizadas em qualquer aspecto da presente invenção onde o ácido nucléico é usado, quer sozinho quer em qualquer combinação.

Sem desejar serem limitados por qualquer teoria, os presentes inventores pressumem que a especificidade observada dos ácidos nucléicos

de ligação de SDF-1 de acordo com a presente invenção partilha algumas características estruturais e em particular uma das seqüências de nucleotídeos as quais também são referidas no mesmo como seqüências de núcleo as quais serão discutidas em mais detalhes a seguir, por meio dos quais é feita referência às Figs. 1 a 8 e ao Exemplo 1. No entanto, deve ser entendido que as Figs. e o Exemplo 1 referidos incorporam várias das características estruturais referidas as quais não têm de ser necessariamente realizadas em cada um e quaisquer dos ácidos nucleicos de acordo com a presente invenção.

Conforme resumido em mais detalhes nas reivindicações e no exemplo 1, as várias moléculas de ácido nucleico de ligação de SDF-1 humano podem ser categorizadas com base nas referidas Caixas e algumas características estruturais e elementos, respectivamente. As várias categorias definidas deste modo também são referidas aqui, neste requerimento de patente, como tipos e mais especificamente como Tipo A, Tipo B e Tipo C.

Em uma modalidade preferencial o ácido nucleico de acordo com a presente invenção é uma única molécula de ácido nucleico. Em uma modalidade adicional, a única molécula de ácido nucleico está presente como uma multitude da única molécula de ácido nucleico. Preferencialmente, os termos ácido nucleico e molécula de ácido nucleico são usados em uma maneira intercambiável aqui, neste requerimento de patente, caso não indicado ao contrário.

Será reconhecido por aqueles versados na técnica que a molécula de ácido nucleico de acordo com a invenção preferencialmente consiste de nucleotídeos os quais são encadeados de modo covalente uns aos outros, preferencialmente através de ligações ou cadeias fosfodiéster.

Os ácidos nucleicos de acordo com a presente invenção também compreenderão ácidos nucleicos os quais são essencialmente homólogos às seqüências em particular reveladas aqui, neste requerimento de patente. O termo substancialmente homólogos será entendido tal como a homologia é de no mínimo 75%, preferencialmente 85%, mais preferencialmente 90% e o mais preferencialmente mais de 95 %, 96 %, 97 %, 98 % ou 99%.

A percentagem real de nucleotídeos homólogos presentes no ácido nucléico de acordo com a presente invenção dependerá do número total de nucleotídeos presentes no ácido nucléico. A percentagem de modificação pode ser baseada no número total de nucleotídeos presentes no ácido nucléico.

A homologia pode ser determinada conforme de conhecimento de uma pessoa versada na técnica. Mais especificamente, um algoritmo de comparação de seqüências em seguida calcula a percentagem de identidade de seqüência para a uma ou mais seqüências de teste em relação à seqüência de referência, com base nos parâmetros do programa designados. A seqüência de teste é preferencialmente a seqüência ou molécula de ácido nucléico a qual se diz que é ou deve ser testada se é homóloga, e em caso positivo, em qual extensão, a outra molécula de ácido nucléico, por meio do que a outra molécula de ácido nucléico também é referida como a seqüência de referência. Em uma modalidade, a seqüência de referência é uma molécula de ácido nucléico conforme descrito aqui, neste requerimento de patente, mais preferencialmente uma molécula de ácido nucléico tendo uma seqüência de acordo com quaisquer das SEQ. ID. NOs. 5 a 144. Alinhamento de seqüências ótimo 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 para método de similaridade de Pearson & Lipman (Pearson & Lipman, 1988), por implementações computadorizadas destes algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, e TFASTA no Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.), ou por inspeção visual.

Um exemplo de um algoritmo que é adequado para determinar a percentagem de identidade de seqüência é o algoritmo usado na ferramenta de pesquisa de alinhamento local básico (nas partes que se seguem "BLAST"), vide, por exemplo, Altschul et al (Altschul et al. 1990 and Altschul et al, 1997). Software para realizar análises BLAST está disponível publicamente através do National Center for Biotechnology Information (nas partes que se

seguem "NCBI"). Os parâmetros default usados na determinação da identidade de seqüência usando o software disponível na NCBI, por exemplo, BLASTN (para seqüências de nucleotídeos) e BLASTP (para seqüências de aminoácidos) são descritos em McGinnis et al (McGinnis et al , 2004).

5 O termo ácido nucléico da invenção ou ácido nucléico de acordo com a presente invenção também compreenderá os ácidos nucléicos compreendendo as seqüências de ácidos nucléicos reveladas aqui, neste requerimento de patente, ou parte das mesmas, preferencialmente na extensão que os ácidos nucléicos ou as partes referidas estão envolvidos na ligação a

10 SDF-1. Um ácido nucléico semelhante pode ser derivado daqueles revelados aqui, neste requerimento de patente, por exemplo, por truncação. Truncação pode ser relacionada com qualquer uma ou ambas as extremidades dos ácidos nucléicos conforme revelado aqui, neste requerimento de patente. Além disso, truncação pode ser relacionada com a seqüência interna de

15 nucleotídeos, isto é, pode ser relacionada com o um ou mais nucleotídeos entre o nucleotídeo 5' e o 3' terminal, respectivamente. Além disso, truncação compreenderá a eliminação de tão pouco quanto um único nucleotídeo da seqüência dos ácidos nucléicos revelados aqui, neste requerimento de patente. Truncação também pode ser relacionada a mais de um trecho do

20 um ou mais ácidos nucléicos da invenção, por meio da qual o trecho pode ser tão pouco quanto um nucleotídeo de extensão. A ligação de um ácido nucléico de acordo com a presente invenção pode ser determinada por aqueles versados na técnica usando experimentos de rotina ou usando ou adotando um método conforme descrito aqui, neste requerimento de patente,

25 preferencialmente conforme descrito aqui, neste requerimento de patente, na parte de exemplos.

Os ácidos nucléicos de acordo com a presente invenção podem ser ou D-ácidos nucléicos ou L-ácidos nucléicos. Preferencialmente, os ácidos nucléicos da invenção são L-ácidos nucléicos. Além disso é possível

30 que uma ou várias partes do ácido nucléico estejam presentes como D-ácidos nucléicos ou no mínimo uma ou várias partes dos ácidos nucléicos sejam L-ácidos nucléicos. O termo "parte" dos ácidos nucléicos significará

tão pouco quanto um nucleotídeo. Semelhantes ácidos nucléicos são geralmente referidos aqui, neste requerimento de patente, como D- e L-ácidos nucléicos, respectivamente. Portanto, em uma modalidade particularmente preferencial, os ácidos nucléicos de acordo com a presente invenção consistem de L-nucleotídeos e compreendem no mínimo um D-nucleotídeo. Semelhante D-nucleotídeo é preferencialmente fixado a uma parte diferente dos trechos definindo os ácidos nucléicos de acordo com a presente invenção, preferencialmente as partes dos mesmos, onde uma interação com outras partes do ácido nucléico está envolvida. Preferencialmente, semelhante D-nucleotídeo é fixado a um término de quaisquer dos trechos e de qualquer ácido nucléico de acordo com a presente invenção, respectivamente. Em uma modalidade preferencial adicional, semelhantes D-nucleotídeos podem agir como um espaçador ou um encadeador, preferencialmente anexando modificações tais como PEG e HES aos ácidos nucléicos de acordo com a presente invenção.

Também está dentro da presente invenção que cada e quaisquer das moléculas de ácido nucléico descritas aqui, neste requerimento de patente, em sua totalidade em termos de sua uma ou mais seqüências de ácido nucléico são limitadas à ou às seqüências de nucleotídeos em particular. Em outras palavras, os termos “compreendendo” ou “compreende(m)” serão interpretados em semelhante modalidade no significado de contendo ou consistindo de.

Também está dentro da presente invenção que os ácidos nucléicos de acordo com a presente invenção são parte de um ácido nucléico mais longo por meio da qual este ácido nucléico mais longo compreende várias partes por meio das quais no mínimo uma parte semelhante é um ácido nucléico, ou uma parte do mesmo, de acordo com a presente invenção. A uma ou mais outras partes destes ácidos nucléicos mais longos podem ser ou um ou vários ácidos nucléicos-D ou ácidos nucléicos-L. Qualquer combinação pode ser usada em conexão com a presente invenção. Estas outras uma ou mais partes do ácido nucléico mais longo podem apresentar uma função a qual é diferente de ligação, preferencialmente de ligação a SDF-1. Uma fun-

ção possível é permitir interação com outras moléculas, por meio da qual as outras moléculas referidas preferencialmente são diferentes de SDF-1, tal como, por exemplo, para imobilização, reticulação, detecção ou amplificação. Em uma modalidade adicional da presente invenção os ácidos nucleícos de acordo com a invenção compreendem, como porções individuais ou combinadas, vários dos ácidos nucleicos da presente invenção. Semelhante ácido nucleico compreendendo vários dos ácidos nucleicos da presente invenção também é englobado pelo termo ácido nucleico mais longo.

5 L-Ácidos nucleicos conforme usado aqui, neste requerimento de patente, são ácidos nucleicos consistindo de L-nucleotídeos, preferencialmente consistindo completamente de L-nucleotídeos.

D-Ácidos nucleicos conforme usado aqui, neste requerimento de patente, são ácidos nucleicos consistindo de D-nucleotídeos, preferencialmente consistindo completamente de D-nucleotídeos.

15 Os termos ácido nucleico e molécula de ácido nucleico são usados aqui, neste requerimento de patente, em uma maneira intercambiável caso não explicitamente indicados ao contrário.

Além disso, caso não indicado ao contrário, qualquer seqüência de nucleotídeos é determinada aqui, neste requerimento de patente, na direção 5' → 3'.

20 Independente de se o ácido nucleico da invenção consiste de D-nucleotídeos, L-nucleotídeos ou uma combinação de ambos com a combinação sendo, por exemplo, uma combinação aleatória ou uma seqüência definida de trechos consistindo de no mínimo um L-nucleotídeo e no mínimo um D-ácido nucleico, o ácido nucleico pode consistir de um ou mais desoxirribonucleotídeos, um ou mais ribonucleotídeos ou combinações dos mesmos.

Desenhar os ácidos nucleicos da invenção como L-ácido nucleico é vantajoso por várias razões. L-ácidos nucleicos são enantiômeros de 30 ácidos nucleicos que ocorrem naturalmente. D-ácidos nucleicos, no entanto, não são muito estáveis em soluções aquosas e particularmente em sistemas biológicos ou amostras biológicas devido à presença disseminada de nucle-

ases. Nucleases que ocorrem naturalmente, particularmente nucleases de células animais não têm capacidade de degradar L-ácidos nucleicos. Por causa disto a meia-vida biológica do L-ácido nucleico é significativamente aumentada em um sistema semelhante, incluindo o corpo animal e humano. Devido

5 à falta de degradabilidade de L-ácido nucleico não são produzidos produtos da degradação de nuclease e portanto não são observados efeitos colaterais surgindo a partir dos mesmos. Este aspecto delimita o L-ácido nucleico de factualmente todos os outros compostos os quais são usados na terapia de doenças e/ou distúrbios envolvendo a presença de SDF-1. L-Ácidos nucleicos os quais especificamente ligam a uma molécula alvo através de um mecanismo diferente de pareamento de bases de Watson Crick, ou aptâmeros os quais consistem parcialmente ou completamente de L-nucleotídeos, particularmente com as partes do aptâmero estando envolvidas na ligação do aptâmero à molécula alvo, também são denominados spiegelmeros.

10

15 Está dentro da presente invenção que o primeiro e o segundo trecho de nucleotídeos flanqueando a seqüência de nucleotídeos de núcleo podem, em princípio, hibridizar um com o outro. Na hibridização referida se forma uma estrutura de filamento duplo. Será reconhecido por uma pessoa versada na técnica que semelhante hibridização pode ocorrer ou não, particularmente sob condições *in vitro* e/ou *in vivo*. Além disso, no caso de semelhante hibridização, não é necessariamente o caso de que a hibridização ocorra sobre toda a extensão dos dois trechos onde, no mínimo com base nas regras para pareamento de bases, pode ocorrer semelhante hibridização e portanto formação de uma estrutura de filamento duplo. Conforme preferencialmente usado aqui, neste requerimento de patente, uma estrutura de

20

25 filamento duplo é uma parte de uma molécula ou uma estrutura formada por dois ou mais filamentos separados, por meio da qual existem no mínimo um, preferencialmente dois ou mais pares de bases os quais são pareamento de bases preferencialmente de acordo com as regras de pareamento de bases de Watson-Crick. Também será reconhecido por uma pessoa versada na técnica que outro pareamento de bases tal como pareamento de bases de Hoogsten pode existir em ou formar a estrutura de filamento duplo referida.

30

Também está dentro da presente invenção que os ácidos nucléicos da invenção, independente se estão presentes como D-ácidos nucléicos, L-ácidos nucléicos ou D,L-ácidos nucléicos ou se são DNA ou RNA, podem estar presentes como ácidos nucléicos de filamento único ou de filamento duplo. Tipicamente, os ácidos nucléicos da invenção são ácidos nucléicos de filamento único os quais apresentam estruturas secundárias definidas devidas às seqüência primárias e portanto também podem formar estruturas terciárias. Os ácidos nucléicos da invenção, no entanto, também podem ser de filamento duplo no significado de que dois filamentos os quais são complementares ou parcialmente complementares um ao outro são hibridizados um ao outro. Isto confere estabilidade ao ácido nucléico a qual, em particular, será vantajosa se o ácido nucléico estiver presente na forma-D que ocorre naturalmente ao invés de na forma-L.

Os ácidos nucléicos da invenção podem ser modificados. Semelhantes modificações podem ser relacionadas com o único nucleotídeo do ácido nucléico e são de conhecimento geral na técnica. Exemplos de semelhante modificação são descritos por, entre outros, Venkatesan et al. (Venkatesan, Kim et al. 2003) e Kusser (Kusser 2000). Semelhante modificação pode ser um átomo de H, um átomo de F ou grupamento O-CH₃ ou grupamento NH₂ na posição 2' do nucleotídeo individual do qual consiste o ácido nucléico. Além disso, o ácido nucléico de acordo com a presente invenção pode compreender no mínimo um nucleotídeo de LNA. Em uma modalidade o ácido nucléico de acordo com a presente invenção consiste de nucleotídeos de LNA.

Em uma modalidade, os ácidos nucléicos de acordo com a presente invenção podem ser um ácido nucléico multipartido. Um ácido nucléico multipartido conforme usado aqui, neste requerimento de patente, é um ácido nucléico o qual consiste de no mínimo dois filamentos de ácido nucléico. Estes no mínimo dois filamentos de ácido nucléico formam uma unidade funcional por meio da qual a unidade funcional é um ligante para uma molécula alvo. Os no mínimo dois filamentos de ácido nucléico podem ser derivados de quaisquer dos ácidos nucléicos da invenção ou por clivagem do ácido

nucléico para gerar dois filamentos ou sintetizando um ácido nucléico correspondente a uma primeira parte do ácido nucléico da invenção, isto é total e outro ácido nucléico correspondente à segunda parte do ácido nucléico total. Deve ser reconhecido que tanto a clivagem quanto a síntese podem
5 ser aplicadas para gerar um ácido nucléico multipartido onde há mais de dois filamentos conforme exemplificado acima. Em outras palavras, os no mínimo dois filamentos de ácido nucléico são tipicamente diferentes de dois filamentos sendo complementares e hibridizam um ao outro embora possa existir uma certa extensão de complementaridade entre as várias partes de
10 ácido nucléico.

Finalmente também está dentro da presente invenção que uma estrutura totalmente fechada, isto é circular, para os ácidos nucléicos de acordo com a presente invenção é realizada, isto é que os ácidos nucléicos de acordo com a presente invenção são fechados, preferencialmente através
15 de uma ligação covalente, por meio da qual mais preferencialmente a referida ligação covalente é feita entre a extremidade 5' e a extremidade 3' das seqüências de ácido nucléico conforme revelado aqui, neste requerimento de patente.

Os presentes inventores descobriram que os ácidos nucléicos de acordo com a presente invenção apresentam uma faixa de valor de Kd muito favorável.
20

Uma possibilidade para determinar a constante de ligação é medição da ressonância de plasmon superficial pelo uso do denominado dispositivo Biacore (Biacore AB, Uppsala, Suécia), o qual também é conhecido
25 por uma pessoa versada na técnica. A afinidade conforme preferencialmente usado aqui, neste requerimento de patente, também foi medida pelo uso de "prova de ligação de *pull down*" conforme descrito nos exemplos. Uma medida apropriada de modo a expressar a intensidade da ligação entre o ácido nucléico e o alvo o qual é no presente caso SDF-1, é o denominado valor da
30 Kd o qual deste modo bem como o método para sua determinação são de conhecimento de uma pessoa versada na técnica.

Os ácidos nucléicos de acordo com a presente invenção são

caracterizados por um valor da K_d determinado. Preferencialmente, o valor da K_d mostrado pelos ácidos nucleicos de acordo com a presente invenção é abaixo de $1\ \mu\text{M}$. Diz-se que um valor da K_d de cerca de $1\ \mu\text{M}$ é característico para uma ligação não específica de um ácido nucleico a um alvo. Conforme será reconhecido por aqueles na técnica, o valor da K_d de um grupo de compostos tais como os ácidos nucleicos de acordo com a presente invenção está dentro de uma certa faixa. A K_d mencionada acima de cerca de $1\ \mu\text{M}$ é um limite superior preferencial para o valor da K_d . O limite inferior preferencial para a K_d de ácidos nucleicos de ligação alvo pode ser cerca de 10 picomolar ou superior. Está dentro da presente invenção que os valores da K_d de ácidos nucleicos individuais ligando a grelina preferencialmente estão dentro desta faixa. Faixas preferenciais podem ser definidas escolhendo qualquer primeiro número dentro desta faixa e qualquer segundo número dentro desta faixa. Valores superiores preferenciais são 250 nM e 100 nM, valores inferiores preferenciais são 50 nM, 10 nM, 1 nM, 100 pM e 10 pM.

As moléculas de ácido nucleico de acordo com a presente invenção podem ter qualquer extensão contanto que ainda sejam capazes de ligar à molécula alvo. Será reconhecido na técnica que são preferenciais extensões dos ácidos nucleicos de acordo com a presente invenções. Tipicamente, a extensão é entre 15 e 120 nucleotídeos. Será reconhecido por aqueles versados na técnica que qualquer inteiro entre 15 e 120 é uma extensão possível para os ácidos nucleicos de acordo com a presente invenção. Faixas mais preferenciais para a extensão dos ácidos nucleicos de acordo com a presente invenção são extensões 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.

Está dentro da presente invenção que os ácidos nucleicos revelados aqui, neste requerimento de patente, compreendem uma porção a qual preferencialmente é uma porção de alto peso molecular e/ou a qual preferencialmente permite modificar as características do ácido nucleico em termos de, entre outros, duração da permanência no corpo do animal, prefe-

rencialmente o corpo humano. Uma modalidade particularmente preferencial de semelhante modificação é PEGuilação e HESilação dos ácidos nucleicos de acordo com a presente invenção. Conforme usado aqui, neste requerimento de patente, PEG significa poli(etileno glicol) e HES significa hidroxietil amido. PEGuilação conforme preferencialmente usado aqui, neste requerimento de patente, é a modificação de um ácido nucleico de acordo com a presente invenção por meio da qual semelhante modificação consiste de um porção PEG a qual é anexada a um ácido nucleico de acordo com a presente invenção. HESilação conforme preferencialmente usado aqui, neste requerimento de patente, é a modificação de um ácido nucleico de acordo com a presente invenção por meio da qual semelhante modificação consiste de uma porção HES a qual é anexada a um ácido nucleico de acordo com a presente invenção. Estas modificações bem como o processo para modificar um ácido nucleico usando semelhantes modificações, são descritas no requerimento de patente Européia No. EP 1 306 382, cuja descoberta é deste modo incorporada em sua totalidade por meio de referência.

Preferencialmente, o peso molecular de uma modificação consistindo de ou compreendendo uma porção de alto peso molecular é cerca de a partir de 2.000 a 200.000 Da, preferencialmente 40.000 a 120.000 Da, particularmente em caso de PEG sendo semelhante porção de alto peso molecular, e é preferencialmente cerca de a partir de 3.000 a 180.000 Da, mais preferencialmente a partir de 60.000 a 140.000 Da, particularmente em caso de HES sendo semelhante porção de alto peso molecular. O processo de modificação por HES é descrito, por exemplo, no requerimento de patente Alemã No. DE 1 2004 006 249.8 cuja descoberta é deste modo incorporada em sua totalidade por meio de referência.

Está dentro da presente invenção que qualquer um de PEG e HES pode ser usado como ou um linear ou ramificado de conforme adicionalmente descrito nos requerimentos de patente No. WO2005074993 e No. PCT/EP02/11950. Semelhante modificação pode ser feita, em princípio, às moléculas de ácido nucleico da presente invenção em qualquer posição das mesmas. Preferencialmente semelhante modificação é feita ou ao nucleotí-

deo de 5' -terminal, ao nucleotídeo de 3'-terminal e/ou qualquer nucleotídeo entre o nucleotídeo 5' e o nucleotídeo 3' da molécula de ácido nucléico.

A modificação e preferencialmente a porção PEG e/ou HES pode ser anexada à molécula de ácido nucléico da presente invenção quer diretamente ou através de um encadeador. Também está dentro da presente invenção que a molécula de ácido nucléico de acordo com a presente invenção compreende uma ou mais modificações, preferencialmente uma ou mais porções PEG e/ou HES. Em uma modalidade a molécula encadeadora individual anexa mais de uma porção PEG ou porção HES a uma molécula de ácido nucléico de acordo com a presente invenção. O encadeador usado em conexão com a presente invenção pode ser o próprio linear ou ramificado. Este tipo de encadeadores é de conhecimento daqueles versados na técnica e estes são adicionalmente descritos nos requerimentos de patente No. WO2005074993 e No. PCT/EP02/11950.

Sem desejar ser limitado por qualquer teoria, parece que modificando os ácidos nucléicos de acordo com a presente invenção com porção de alto peso molecular tal como um polímero e mais particularmente os polímeros revelados aqui, neste requerimento de patente, os quais são preferencialmente fisiologicamente aceitáveis, a cinética de excreção é alterada. Mais particularmente, parece que devido ao aumentado peso molecular de semelhantes ácidos nucléicos modificados da invenção e devido aos ácidos nucléicos não estarem sujeitos a metabolismo particularmente quando na forma L, a excreção a partir de um corpo animal, preferencialmente de um corpo de mamífero e mais preferencialmente de um corpo humano é reduzida. Como a excreção tipicamente ocorre através dos rins, os presentes inventores presumiram que a taxa de filtração glomerular do ácido nucléico modificado deste modo é significativamente reduzida comparados com os ácidos nucléicos não tendo este tipo de modificação de alto peso molecular o qual resulta em um aumento na duração da permanência no corpo. Em conexão com isto é particularmente digno de nota que, apesar de semelhante modificação de alto peso molecular a especificidade do ácido nucléico de acordo com a presente invenção não é afetada em uma maneira prejudicial.

Insofar, os ácidos nucleicos de acordo com a presente invenção têm características surpreendentes – as quais normalmente não podem ser esperadas de compostos farmacologicamente ativos – de tal modo que uma formulação farmacêutica proporcionando uma liberação gradual não é necessariamente
5 requerida para proporcionar uma liberação gradual. Ao contrário os ácidos nucleicos de acordo com a presente invenção em sua forma modificada compreendendo uma porção de alto peso molecular, já podem ser usados no estado em que se encontram como uma formulação de liberação gradual. *Insofar*, a uma ou mais modificações das moléculas de ácido nucleico conforme revelado aqui, neste requerimento de patente, e as moléculas de ácido nucleico modificadas deste modo e qualquer composição compreendendo as mesmas podem proporcionar uma farmacocinética e biodistribuição das mesmas distintas e preferencialmente controladas. Isto também inclui duração da permanência na circulação e distribuição para tecidos. As modificações referidas são adicionalmente descritas no requerimento de patente
10 15 No. PCT/EP02/11950.

No entanto, está dentro da presente invenção que os ácidos nucleicos revelados aqui, neste requerimento de patente, não compreendem qualquer modificação e particularmente nenhuma modificação de alto peso molecular tal como PEGuilação ou HESilação. A modalidade referida é particularmente preferenciais quando se deseja um clearance rápido dos ácidos nucleicos do corpo depois da administração. O clearance rápido referido pode ser desejado em caso de estudo por imagens *in vivo* ou requisitos específicos de dosagem terapêutica usando os ácidos nucleicos ou medicamentos
20 25 compreendendo os mesmos, de acordo com a presente invenção.

Os ácidos nucleicos da invenção, os quais também são referidos aqui, neste requerimento de patente, 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 produção ou fabricação de um medicamento. O medicamento referido contém no mínimo um dos ácidos nucleicos da invenção, opcionalmente junto com compostos farmacologicamente ativos
30 adicionais, por meio da qual o ácido nucleico da invenção preferencialmente

age como o próprio composto farmaceuticamente ativo. Os medicamentos referidos compreendem em modalidades preferenciais no mínimo um veículo farmaceuticamente aceitável. O veículo referido pode ser, por exemplo, água, tampão, PBS, solução de glicose, solução de sacarose, solução de manose, preferencialmente uma solução balanceada a 5% de sacarose, amido, açúcar, gelatina ou qualquer outra substância de veículo aceitável. Os veículos referidos são geralmente conhecidos por uma pessoa versada na técnica. Será reconhecido por uma pessoa versada na técnica que quaisquer modalidades, uso e aspectos de ou relacionados com o medicamento da presente invenção também são aplicáveis à composição farmacêutica da presente invenção e vice versa.

A indicação, doenças e distúrbios para o tratamento e/ou prevenção das quais os ácidos nucleicos, as composições farmacêuticas e medicamentos de acordo com ou preparados de acordo com a presente invenção resultam do envolvimento, quer direto ou indireto, de SDF-1 no mecanismo patogênico respectivo.

Logicamente, como os ácidos nucleicos de ligação de SDF-1 de acordo com a presente invenção interagem com ou ligam a SDF-1 humano ou murino, uma pessoa versada geralmente entenderá que os ácidos nucleicos de ligação de SDF-1 de acordo com a presente invenção podem ser facilmente usados para o tratamento, a prevenção e/ou diagnóstico de qualquer doença conforme descrito aqui, neste requerimento de patente, de humanos e animais.

Doença e/ou distúrbios e/ou condições de doença para o tratamento e/ou a prevenção das quais o medicamento referido pode ser usado incluem, mas não estão limitadas a doenças do fundo de olho como retinopatia, retinopatia diabética e degeneração macular relacionada com a idade, tanto a forma seca quanto úmida; câncer; câncer de mama, ovários, próstata, pâncreas, tireóide, nasofaringe, cólon, pulmão, e estômago; osteosarcoma; melanoma; glioma; medulo- e neuroblastoma; leucemia; leucemia linfocítica crônica de células B; mieloma múltiplo; linfoma; síndrome de WHIM; síndromes de deficiência imunológica; neovascularização patológica; inflamação;

esclerose múltipla; artrite, artrite reumatóide, osteoartrite e nefrite.

Em uma modalidade adicional, o medicamento compreende um agente farmacologicamente ativo adicional. Semelhantes compostos farmacologicamente ativos adicionais podem ser os conhecidos por aqueles versados na técnica e são preferencialmente selecionados entre o grupo compreendendo antagonistas de citocina ou quimocina, corticosteróides, e semelhantes. Será entendido por uma pessoa versada na técnica que dadas as várias indicações as quais podem ser tratadas de acordo com a presente invenção pelos ácidos nucleicos de acordo com a presente invenção, o um ou mais agentes farmacologicamente ativos adicionais referidos podem ser qualquer um o qual em princípio é adequado para o tratamento e/ou prevenção de semelhantes doenças. As moléculas de ácido nucleico de acordo com a presente invenção, particularmente caso presentes ou usadas como um medicamento, são preferencialmente combinadas com inibidores de VEGF tais como Macugen (Pegatanib) da Pfizer Ophthalmics, Lucentis (Ranitizumab) da Novartis Ophthalmics, Avastin (Bevacizumab) da Roche (off-label use); ou com terapia fotodinâmica tal como Visudyne (Verteporfin) da Novartis Ophthalmics e derivado de cortisona injetável intravitalmente tal como Retaane (Anecortave acetate) da Alcon Inc.

Alternativamente, ou adicionalmente, o agente farmacologicamente ativo adicional referido é um ácido nucleico adicional de acordo com a presente invenção. Alternativamente, o medicamento compreende no mínimo mais um ácido nucleico o qual liga a uma molécula alvo diferente de SDF-1 ou apresenta uma função a qual é diferente da função dos ácidos nucleicos de acordo com a presente invenção.

Conforme será reconhecido por aqueles da técnica os ácidos nucleicos da invenção podem ser usados efetivamente em qualquer doença onde um antagonista para SDF-1 pode ser administrado a um paciente que necessite de semelhante antagonista e semelhante antagonista seja adequado para eliminar a causa da doença ou do distúrbio ou no mínimo para reduzir os efeitos da doença ou do distúrbio. O efeito referido inclui, mas não está limitado a neovascularização patológica, inflamação e metástase. A a-

plicabilidade dos ácidos nucléicos de acordo com a presente invenção em conexão com estas e outras doenças ou distúrbios resulta, entre outros, do envolvimento de SDF-1 conforme resumido na parte introdutória da presente especificação a qual é incorporada aqui, a este requerimento de patente, por
5 meio de referência de modo a evitar qualquer repetição desnecessária.

Está dentro da presente invenção que o medicamento é alternativamente ou adicionalmente usado, em princípio, para a prevenção de quaisquer das doenças reveladas em conexão com o uso do medicamento para o tratamento das doenças referidas. Marcadores respectivos portanto,
10 isto é, para as doenças respectivas são conhecidos por aqueles versados na técnica. Preferencialmente, o marcador respectivo é SDF-1. Alternativamente e/ou adicionalmente, o marcador respectivo é selecionado entre o grupo de marcadores de stress oxidativo, compreendendo transmembrana redutase de ferricianeto (TMR), aumentada atividade do caminho do sorbitol que
15 inclui depois de acumulação de sorbitol, aumentada proporção de NADH/NAD citosólico, depleção de NADPH e acumulação de frutose com a produção não enzimática resultante de produtos finais de glicação avançada (AGES) e conseqüente ativação da proteína quinase C, eventos a jusante mediados por stress oxidativo e nitrosativo tais como ativação da MAP quinase; marcadores inflamatórios, compreendendo ICAM-1, VCAM-1, RANTES, haptoglobina, ou proteína C reativa; e marcadores pró-angiogênicos como eritropoetina ou VEGF. Em vista disto, os marcadores referidos podem ser usados para determinar se ou não um sujeito ou um paciente pode ser
20 tratado com quaisquer das moléculas de ácido nucléico de acordo com a presente invenção. Portanto, em um aspecto adicional, a presente invenção se refere a semelhante método, por meio do qual a presença ou ausência e mais especificamente a concentração do um ou mais marcadores respectivos é/são determinada(s). Métodos para a detecção dos marcadores referidos e opcionalmente sua quantificação, bem como a faixa dentro da qual o
25 marcador respectivo estará presente ou ausente de modo a decidir se ou não o sujeito ou paciente está sofrendo de quaisquer das doenças referidas ou está em risco de desenvolver as doenças referidas, e, por conseguinte,

pode portanto ser tratado de acordo com a presente invenção, são conhecidos por aqueles versados na técnica.

Em uma modalidade do medicamento da presente invenção, o medicamento é para uso em combinação com outros tratamentos para quaisquer das doenças reveladas aqui, neste requerimento de patente, particularmente aquelas para as quais o medicamento da presente invenção deve ser usado.

"Terapia de combinação" (ou "co-terapia") inclui a administração de um medicamento da invenção e no mínimo um segundo agente como parte de um regime de tratamento específico pretendido para proporcionar o efeito benéfico da co-ação destes agentes terapêuticos, isto é, o medicamento da presente invenção e o segundo agente referido. O efeito benéfico da combinação inclui, mas não está limitado a, co-ação farmacocinética ou farmacodinâmica resultante da combinação de agentes terapêuticos. A administração destes agentes terapêuticos em combinação tipicamente é realizada durante um período de tempo definido (geralmente minutos, horas, dias ou semanas dependendo da combinação selecionada).

"Terapia de combinação" pode, mas geralmente não, pretender englobar a administração de dois ou mais destes agentes terapêuticos como parte de regimes de monoterapia separada que incidentalmente e arbitrariamente resultam nas combinações da presente invenção. "Terapia de combinação" pretende englobar a administração destes agentes terapêuticos em uma maneira seqüencial, isto é, em que cada agente terapêutico é administrado em uma hora diferente, bem como a administração destes agentes terapêuticos, ou no mínimo dois dos agentes terapêuticos, em uma maneira substancialmente simultânea. Administração substancialmente simultânea pode ser realizada, por exemplo, administrando a um sujeito uma única cápsula tendo uma proporção fixa de cada agente terapêutico ou em múltiplas, cápsulas únicas para cada um dos agentes terapêuticos.

Administração seqüencial ou substancialmente simultânea de cada agente terapêutico pode ser realizada por qualquer via apropriada incluindo, mas não limitada a, vias tópicas, vias orais, vias intravenosas, vias

intramusculares, e absorção direta através dos tecidos das membranas mucosas. Os agentes terapêuticos podem ser administrados pela mesma via ou por vias diferentes. Por exemplo, um primeiro agente terapêutico da combinação selecionada pode ser administrado por injeção ao passo que os outros agentes terapêuticos da combinação podem ser administrados topicamente.

Alternativamente, por exemplo, todos os dos agentes terapêuticos podem ser administrados topicamente ou todos os dos agentes terapêuticos podem ser administrados por injeção. A sequência na qual os dos agentes terapêuticos são administrados não é estreitamente crítica a menos que mencionado de modo diverso. "Terapia de combinação" também pode englobar 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 não fármaco, O tratamento não fármaco pode ser conduzido em qualquer momento adequado na medida que seja obtido um efeito benéfico da coação da combinação dos agentes terapêuticos e o tratamento não fármaco. Por exemplo, em casos apropriados, o efeito benéfico ainda é obtido quanto o tratamento não fármaco é temporariamente removido da administração dos agentes terapêuticos, talvez por dias ou mesmo semanas.

Conforme resumido em termos gerais acima, o medicamento de acordo com a presente invenção pode ser administrado, em princípio, em qualquer forma de conhecimento daqueles versados na técnica. Uma via de administração preferencial é administração sistêmica, mais preferencialmente por administração parenteral, preferencialmente por injeção. Alternativamente, o medicamento pode ser administrado localmente. Outras vias de administração compreendem intramuscular, intraperitoneal, e subcutânea, *per orum*, intranasal, intratraqueal ou pulmonary com preferência dada à via de administração que é a menos invasiva, ao mesmo tempo que assegurando a eficiência.

Administração parenteral é geralmente usada para injeções e infusões subcutâneas, intramusculares ou intravenosas. Adicionalmente,

uma abordagem para administração parenteral emprega a implantação de alguns sistemas de liberação lenta ou de liberação gradual, os quais asseguram que seja mantido um nível de dosagem constante, que são de conhecimento geral daqueles ordinariamente versados na técnica.

5 Além disso, medicamentos preferenciais da presente invenção podem ser administrados em forma intranasal através de uso tópico de veículos intranasais adequados, inalantes, ou através de vias transdérmicas, usando as formas de emplastos de pele transdérmicos de conhecimento geral daqueles ordinariamente versados na técnica. Para ser administrada
10 sob a forma de um sistema de liberação transdérmica, a administração da dosagem, logicamente, será contínua ao invés de intermitente do início ao fim do regime da dosagem. Outras preparações tópicas preferenciais incluem cremes, pomadas, loções, sprays de aerosol e géis, em que a concentração de ingrediente ativo tipicamente variaria de 0,01% a 15%, em peso /
15 peso ou em peso / volume.

 O medicamento da presente invenção geralmente compreenderá uma quantidade eficaz do um ou mais componentes ativos da terapia, incluindo, mas não limitado a, uma molécula de ácido nucléico da presente invenção, dissolvida ou dispersada em um meio farmacêuticamente aceitável.
20 Meios ou carregadores farmacêuticamente aceitáveis incluem quaisquer e todos os solventes, meios de dispersão, revestimentos, agentes antibacterianos e antifúngicos, agentes isotônicos e de retardamento da absorção e semelhantes. O uso de semelhantes meios e agentes para substâncias ativas farmacêuticas é de conhecimento geral na técnica. Ingredientes ativos
25 suplementares também podem ser incorporados no medicamento da presente invenção.

 Em um aspecto adicional a presente invenção se refere a uma composição farmacêutica. A composição farmacêutica referida compreende no mínimo um dos ácidos nucléicos de acordo com a presente invenção e
30 preferencialmente um aglutinante farmacêuticamente aceitável. O aglutinante referido pode ser qualquer aglutinante usado e/ou conhecido na técnica. Mais particularmente o aglutinante referido é qualquer aglutinante conforme

discutido em conexão com a fabricação do medicamento revelado aqui, neste requerimento de patente. Em uma modalidade adicional, a composição farmacêutica compreende um agente farmacêuticamente ativo adicional.

5 A preparação de um medicamento e uma composição farmacêutica será de conhecimento daqueles versados na técnica à luz da presente descoberta. Tipicamente, as composições referidas podem ser preparadas como injetáveis, quer como soluções ou suspensões líquidas; formas sólidas adequadas para solução em, ou suspensão em, líquido antes da injeção; como comprimidos ou outros sólidos para administração oral; como cápsulas
10 de liberação com o tempo (*time release*); ou em qualquer outra forma atualmente usada, incluindo gotas oculares, cremes, loções, pomadas, inalantes e semelhantes. The uso de formulações estéreis, tais como lavagens à base de salina, por cirurgiões, médicos ou funcionários de tratamento de saúde para tratar uma área particular no campo de operação também pode ser particularmente útil. Composições também podem ser liberadas através de mi-
15 crodispositivo, micropartícula ou esponja.

Na formulação, um medicamento será administrado em uma maneira compatível com a formulação da dosagem, e em uma quantidade tal qual é farmacologicamente eficaz. As formulações são facilmente admi-
20 nistradas em uma variedade de formas de dosagem, tais como o tipo de soluções injetáveis descritas acima, mas também podem ser empregadas cápsulas de liberação de fármaco e semelhantes.

Neste contexto, a quantidade de ingrediente ativo e o volume da composição a ser administrado depende do indivíduo ou do sujeito a ser tra-
25 tado. Quantidades específicas de composto ativo requeridas para administração dependem do critério do clínico e são peculiares a cada indivíduo.

Tipicamente é utilizado um volume mínimo de um medicamento requerido para dispersar os compostos ativos. Regimes adequados para administração também são variáveis, mas seriam tipificados inicialmente
30 administrando o composto e monitorando os resultados e em seguida administrando doses controladas adicionais em intervalos adicionais.

Por exemplo, para administração oral sob a forma de um com-

primido ou cápsula (por exemplo, uma cápsula de gelatina), o componente de fármaco ativo, isto é, uma molécula de ácido nucléico da presente invenção e/ou qualquer agente farmacêuticamente ativo adicional, também referidos aqui, neste requerimento de patente, como agente(s) terapêutico(s) ou composto(s) ativo(s) podem ser combinados com um carregador inerte oral, não-tóxico, farmacêuticamente aceitável tal como etanol, glicerol, água e semelhantes. Além disso, quando desejado ou necessário, aglutinantes, lubrificantes, agentes desintegrantes, e agentes colorantes adequados também podem ser incorporados na mistura. Aglutinantes adequados incluem amido, silicato de alumínio de magnésio, pasta de amido, gelatina, metilcelulose, carboximetilcelulose de sódio e/ou polivinilpirrolidona, açúcares naturais tais como glucose ou beta-lactose, adoçantes de milho, gomas naturais e sintéticas tais como acacia, tragacanto ou alginato de sódio, polietileno glicol, ceras, e semelhantes. 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 polietileno glicol, e semelhantes. Desintegrantes incluem, sem limitação, amido, metil celulose, agar, bentonita, amidos de goma xantano, agar, ácido algínico ou seu sal de sódio, ou misturas efervescentes, e semelhantes. Diluentes, incluem, por exemplo, lactose, dextrose, sucrose, manitol, sorbitol, celulose e/ou glicina.

O medicamento da invenção também pode ser administrado em formas de dosagens orais tais como comprimidos ou cápsulas de liberação cronometrada e de liberação gradual, pílulas, pós, grânulos, elixires, tinturas, suspensões, xaropes e emulsões. Supositórios são preparados vantajosamente a partir de suspensões ou emulsões oleosas.

A composição farmacêutica ou medicamento pode ser esterilizada e/ou conter adjuvantes, tais como agentes preservantes, estabilizantes, umectantes ou emulsificantes, estimuladores de solução, sais para regular a pressão osmótica e/ou tampões. Além disso, também podem conter outras substâncias terapêuticamente valiosas. As composições são preparadas de acordo com métodos convencionais de mistura, granulação, ou revestimen-

to, e tipicamente contêm cerca de 0,1% a 75%, preferencialmente cerca de 1% a 50%, do ingrediente ativo.

Composições líquidas, particularmente injetáveis podem ser preparadas, por exemplo, dissolvendo, dispersando, e etc. O composto ativo
5 é dissolvido em ou misturado com um solvente farmacêuticamente puro tal como, por exemplo, água, salina, dextrose aquosa, glicerol, etanol, e semelhantes, para deste modo formar a solução ou suspensão injetável. Adicionalmente, podem ser formuladas formas sólidas adequadas para dissolver em líquido antes da injeção.

10 Para composições sólidas, excipientes incluem graus farmacêuticos de manitol, lactose, amido, estearato de magnésio, sacarina de sódio, talco, celulose, glucose, sucrose, carbonato de magnésio, e semelhantes. O composto ativo definido acima, também pode ser formulado como supositórios, usando, por exemplo, polialquilenoglicóis, por exemplo, propileno glicol,
15 como o carregador. Em algumas modalidades, supositórios são preparados vantajosamente a partir de suspensões ou emulsões oleosas.

Os medicamentos e moléculas de ácido nucléico, respectivamente, da presente invenção também podem ser administrados sob a forma de sistemas de liberação de lipossomas, tais como pequenas vesículas unilamelares, grandes vesículas unilamelares e vesículas multilamelares. Li-
20 lipossomas podem ser formados a partir de uma variedade de fosfolípidos, contendo colesterol, estearilamina ou fosfatidilcolinas. Em algumas modalidades, um filme de componentes lipídicos é hidratado com uma solução aquosa de fármaco para uma forma de camada lipídica encapsulando o fármaco, o que é de conhecimento geral das pessoas ordinariamente versadas
25 na técnica. Por exemplo, as moléculas de ácido nucléico descritas aqui, neste requerimento de patente, podem ser proporcionadas como um complexo com um composto lipofílico ou composto não-imunogênico, de alto peso molecular construído usando métodos conhecidos na técnica. Adicionalmente,
30 lipossomas podem portar as moléculas de ácido nucléico referidas sobre sua superfície para direcionar e carregar agentes citotóxicos internamente para mediar destruição celular. Um exemplo de complexos associados a ácidos

nucléicos é proporcionado na Patente dos Estados Unidos No. 6.011.020.

Os medicamentos e moléculas de ácido nucléico, respectivamente, da presente invenção também podem ser acoplados com polímeros solúveis como veículos de fármacos direcionáveis. Os polímeros referidos
5 podem incluir polivinilpirrolidona, copolímero de pirano, polihidroxipropilmetacrilamida-fenol, polihidroxietilaspanamida-fenol, ou polietilenoóxido-polilisina substituída com resíduos palmitoíla. Além disso, os medicamentos e moléculas de ácido nucléico, respectivamente, da presente invenção podem ser acoplados a uma classe de polímeros biodegradáveis úteis para obter
10 liberação controlada de uma *drag*, por exemplo, ácido poliláctico, poliépsilon capro lactona, ácido polihidróxi butírico, poliortoésteres, poliacetais, polidiidropiranos, policianoacrilatos e copolímeros em bloco reticulados ou anfipáticos de hidrogéis.

Caso desejado, a composição farmacêutica e medicamento,
15 respectivamente, a serem administrados também podem conter quantidades menores de substâncias auxiliares não-tóxicas tais como agentes umectantes ou emulsificantes, agentes de tamponamento de pH, e outras substâncias tais como, por exemplo, acetato de sódio, e oleato de trietanolamina.

O regime de dosagem utilizando as moléculas de ácido nucléico
20 e medicamentos, respectivamente, da presente invenção é selecionado de acordo com uma variedade de fatores incluindo tipo, espécie, idade, sexo, sexo e condição médica do paciente; a gravidade da condição a ser tratada; a via de administração; a função renal e hepática do paciente; e o aptâmero em particular ou sal do mesmo empregado. Um médico ou veterinário ordi-
25 nariamente versado pode prontamente determinar e prescrever a quantidade eficaz do fármaco requerida para prevenir, neutralizar ou interromper o progresso da condição.

Níveis plasmáticos eficazes do ácido nucléico de acordo com a presente invenção preferencialmente variam de 500 fM a 500 μ M no trata-
30 mento de quaisquer das doenças reveladas aqui, neste requerimento de patente.

As moléculas de ácido nucléico e medicamentos, respectiva-

mente, da presente invenção podem preferencialmente ser administrados em uma única dose diária, a cada dois ou três dias, semanalmente, a cada duas semanas, em uma única dose mensal ou a cada três meses.

5 Está dentro da presente invenção que o medicamento conforme descrito aqui, neste requerimento de patente, constitua a composição farmacêutica revelada aqui, neste requerimento de patente.

Em um aspecto adicional a presente invenção se refere a um método para o tratamento de um sujeito que esteja necessitando de semelhante tratamento, por meio do qual o método compreende a administração
10 de uma quantidade farmacologicamente ativa de no mínimo um dos ácidos nucleicos de acordo com a presente invenção. Em uma modalidade, o sujeito sofre de uma doença ou está em risco de desenvolver a referida doença, por meio da qual a doença é qualquer uma das reveladas aqui, neste requerimento de patente, particularmente qualquer uma das doenças reveladas
15 em conexão com o uso de quaisquer dos ácidos nucleicos de acordo com a presente invenção para a fabricação de um medicamento.

Conforme preferencialmente usado aqui, neste requerimento de patente, um diagnóstico ou agente de diagnóstico ou meio diagnóstico é adequado para detectar, quer diretamente ou indiretamente SDF-1 conforme
20 descrito aqui, neste requerimento de patente, em conexão com os vários distúrbios e doenças descritos aqui, neste requerimento de patente. O diagnóstico é adequada para a detecção e/ou o seguimento de quaisquer dos distúrbios e doenças, respectivamente, descritos aqui, neste requerimento de patente. Semelhante detecção é possível através da ligação dos ácidos
25 nucleicos de acordo com a presente invenção a SDF-1. Semelhante ligação pode ser detectada quer diretamente quer indiretamente. Os métodos e meios respectivos são de conhecimento daqueles versados na técnica. Entre outros, os ácidos nucleicos de acordo com a presente invenção podem compreender uma etiqueta a qual permite a detecção dos ácidos nucleicos de
30 acordo com a presente invenção, preferencialmente o ácido nucleico liga a SDF-1. Uma etiqueta semelhante é preferencialmente selecionada entre o grupo compreendendo etiquetas radioativas, enzimáticas e fluorescentes.

Em princípio, todos os testes conhecidos desenvolvidos para anticorpos podem ser adotados para os ácidos nucleicos de acordo com a presente invenção visto que o anticorpo de ligação alvo é substituído por um ácido nucleico de ligação alvo. Em provas de anticorpo usando anticorpos de ligação

5 alvo não marcados a detecção é feita preferencialmente por um anticorpo secundário o qual é modificado com etiquetas radioativas, enzimáticas e fluorescentes e ligam ao anticorpo de ligação alvo em seu fragmento Fc. No caso de um ácido nucleico, preferencialmente um ácido nucleico de acordo com a presente invenção, o ácido nucleico é modificado com uma etiqueta

10 semelhante, por meio da qual preferencialmente uma etiqueta semelhante é selecionada entre o grupo compreendendo biotina, Cy-3 e Cy-5, e a etiqueta referida é detectada por um anticorpo dirigido contra a etiqueta referida, por exemplo, um anticorpo anti-biotina, um anticorpo anti-Cy3 ou um anticorpo anti-Cy5, ou – no caso que a etiqueta é biotina – a etiqueta é detectada por

15 estreptavidina ou avidina as quais ligam naturalmente a biotina. O referido anticorpo, estreptavidina ou avidina por sua vez é preferencialmente modificado com uma etiqueta respectiva, por exemplo, uma etiqueta radioativa, enzimática ou fluorescente (como um anticorpo secundário).

Em uma modalidade adicional as moléculas de ácido nucleico de

20 acordo com a invenção são detectadas ou analisadas por um segundo meio de detecção, em que o referido meio de detecção é um sinal molecular. A metodologia de sinal molecular é de conhecimento das pessoas versadas na técnica. Em resumo, sondas de ácidos nucleicos as quais também são referidas como sinais moleculares, são um complemento reverso para a amostra

25 de ácidos nucleicos a ser detectada e hibridizam devido a isto a uma parte da amostra de ácido nucleico a ser detectada. Ao ligar à amostra de ácido nucleico os grupamentos fluorofóricos do sinal molecular são separados o que resulta em uma mudança do sinal de fluorescência, preferencialmente uma mudança na intensidade. Esta mudança se correlaciona com a quantidade da amostra de ácidos nucleicos presente.

30

Será entendido por uma pessoa versada na técnica que devido à relação resumida aqui, neste requerimento de patente, entre SDF-1 e seu

receptor correspondente, as doenças e condições as quais podem ser diagnosticadas usando as moléculas de ácido nucléico da presente invenção, são, em princípio, as mesmas conforme descrito aqui, neste requerimento de patente, em conexão com o uso das referidas moléculas de ácido nucléico para o tratamento e/ou prevenção da referida doença.

À parte disto, usos adicionais das moléculas de ácido nucléico de acordo com a presente invenção residem em uma redução na hematopoiese, uma redução na invasão ou metástase, uma redução no desenvolvimento e quimiotaxia de células B, uma redução na quimioatração de células T e uma indução de parada de crescimento de apoptose.

Em conexão com a detecção de SDF-1 um método preferencial compreende as seguintes etapas:

- (a) proporcionar uma amostra a qual deve ser testada para a presença de SDF-1,
- (b) proporcionar um ácido nucléico de acordo com a presente invenção,
- (c) reagir a amostra com o ácido nucléico, preferencialmente em um vaso de reação por meio do qual a etapa (a) pode ser realizada antes da etapa (b), ou a etapa (b) realizada antes da etapa (a).

Em uma modalidade preferencial é proporcionada uma etapa adicional d), a qual consiste na detecção da reação da amostra com o ácido nucléico. Preferencialmente, o ácido nucléico da etapa b) é imobilizado a uma superfície. A superfície pode ser a superfície de um vaso de reação tal como um tubo de reação, uma cavidade de uma lâmina, ou a superfície de um dispositivo contido em semelhante vaso de reação tal como, por exemplo, uma conta. A imobilização do ácido nucléico à superfície pode ser feita por quaisquer meios de conhecimento daqueles versados na técnica incluindo, mas não limitados a, ligações não-covalentes ou covalentes. Preferencialmente, a ligação é estabelecida através de uma ligação química covalente entre a superfície e o ácido nucléico. No entanto, também está dentro da presente invenção que o ácido nucléico é indiretamente imobilizado a uma

superfície, por meio da qual semelhante imobilização indireta envolve o uso de um componente adicional ou um par de parceiros de interação. Semelhante componente adicional é preferencialmente um composto o qual especificamente interage com o ácido nucléico a ser imobilizado o qual também é

5 referido como parceiro de interação, e portanto media a fixação do ácido nucléico à superfície. O parceiro de interação é preferencialmente selecionado entre o grupo compreendendo ácidos nucléicos, polipeptídeos, proteínas e anticorpos. Preferencialmente, o parceiro de interação é um anticorpo, mais preferencialmente um anticorpo monoclonal. Alternativamente, o parceiro de

10 interação é um ácido nucléico, preferencialmente um ácido nucléico funcional. Mais preferencialmente semelhante ácido nucléico funcional é selecionado entre o grupo compreendendo aptâmeros, spiegelmeros, e ácidos nucléicos os quais são no mínimo parcialmente complementares ao ácido nucléico. Em uma modalidade alternativa adicional, a ligação do ácido nucléico

15 à superfície é mediada por um parceiro de interação multi-partite. Semelhante parceiro de interação multi-partite é preferencialmente um par de parceiros de interação ou um parceiro de interação consistindo de um primeiro membro e um segundo membro, por meio do qual o primeiro membro é compreendido por ou anexado ao ácido nucléico e o segundo membro é a-

20 nexado a ou compreendido pela superfície. O parceiro de interação multi-partite é preferencialmente selecionado entre o grupo de pares de parceiros de interação compreendendo biotina e avidina, biotina e estreptavidin, e biotina e neutravidina. Preferencialmente, o primeiro membro do par de parceiros de interação é biotina.

25 Um resultado preferencial de semelhante método é a formação de um complexo imobilizado de SDF-1 e o ácido nucléico, por meio do qual mais preferencialmente o referido complexo é detectado. Está dentro de uma modalidade que a partir do complexo o SDF-1 é detectado.

O método para a detecção de SDF-1 também compreende que a

30 amostra é removida do vaso de reação o qual preferencialmente foi usado para realizar a etapa c).

O método compreende em uma modalidade adicional também a

etapa de imobilizar um parceiro de interação de SDF-1 sobre uma superfície, preferencialmente uma superfície conforme definido acima, por meio da qual o parceiro de interação é definido conforme aqui, neste requerimento de patente, e preferencialmente como acima em conexão com o método respectivo e mais preferencialmente compreende ácidos nucleicos, polipeptídeos, proteínas e anticorpos em suas várias modalidades. Nesta modalidade, um meio de detecção particularmente preferencial é um ácido nucleico de acordo com a presente invenção, por meio do qual o ácido nucleico referido preferencialmente pode ser marcado ou não marcado. No caso do ácido nucleico referido ser marcado, pode ser detectado diretamente ou indiretamente. Semelhante detecção também pode envolver o uso de um segundo meio de detecção o qual é, preferencialmente, também selecionado entre o grupo compreendendo ácidos nucleicos, polipeptídeos, proteínas e modalidades nas várias modalidades descritas aqui, neste requerimento de patente. Semelhantes meios de detecção são preferencialmente específicos para o ácido nucleico de acordo com a presente invenção. Em uma modalidade mais preferencial, o segundo meio de detecção é um sinal molecular. Ou o ácido nucleico ou o segundo meio de detecção ou ambos podem compreender em uma modalidade preferencial uma etiqueta de detecção. A etiqueta de detecção é preferencialmente selecionada entre o grupo compreendendo biotina, uma etiqueta de bromo-desoxiuridina, uma etiqueta de digoxigenina, uma etiqueta de fluorescência, uma etiqueta UV, uma radio-etiqueta, e uma molécula queladora. Alternativamente, o segundo meio de detecção interage com a etiqueta de detecção a qual é preferencialmente contida por, compreendida por ou anexada ao ácido nucleico. Combinações particularmente preferenciais são como se segue:

- a etiqueta de detecção é biotina e o segundo meio de detecção é um anticorpo dirigido contra biotina, ou em que
- a etiqueta de detecção é biotina e o segundo meio de detecção é uma avidina ou uma molécula carregando avidina, ou em que
- a etiqueta de detecção é biotina e o segundo meio de detecção é uma estreptavidina ou uma molécula carregando estreptavidina, ou em que

a etiqueta de detecção é biotina e o segundo meio de detecção é uma neutravidina ou uma molécula carregando neutravidina, ou

em que a etiqueta de detecção é uma bromo-desoxiuridina e o segundo meio de detecção é um anticorpo dirigido contra bromo-desoxiuridina, or em que

a etiqueta de detecção é uma digoxigenina e o segundo meio de detecção é um anticorpo dirigido contra digoxigenina, ou

em que a etiqueta de detecção é um quelador e o segundo meio de detecção é um radionuclídeo, por meio da qual é preferencial que a referida etiqueta de detecção seja anexada ao ácido nucléico. Deve ser reconhecido que este tipo de combinação também é aplicável à modalidade em que o ácido nucléico é anexado à superfície. Em semelhante modalidade é preferencial que a etiqueta de detecção seja anexada ao parceiro de interação.

Finalmente, também está dentro da presente invenção que e o segundo meio de detecção é detectado usando um terceiro meio de detecção, preferencialmente o terceiro meio de detecção é uma enzima, mais preferencialmente apresentando uma reação enzimática na detecção do segundo meio de detecção, ou o terceiro meio de detecção é um meio para detectar radiação, mais preferencialmente radiação emitida por um radionuclídeo. Preferencialmente, o terceiro meio de detecção é especificamente detectar e/ou interagir com o segundo meio de detecção.

Além disso na modalidade com um parceiro de interação de SDF-1 sendo imobilizado sobre uma superfície e o ácido nucléico de acordo com a presente invenção sendo preferencialmente adicionado ao complexo formado entre o parceiro de interação e o SDF-1, a amostra pode ser removida da reação, mais preferencialmente do vaso de reação onde são realizadas a etapa c) e/ou a etapa d).

Em uma modalidade o ácido nucléico de acordo com a presente invenção compreende uma porção de fluorescência e por meio da qual a fluorescência da porção de fluorescência é diferente na formação de complexo entre o ácido nucléico e SDF-1 e SDF-1 livre.

Em uma modalidade adicional o ácido nucléico é um derivado do ácido nucléico de acordo com a presente invenção, por meio da qual o derivado do ácido nucléico compreende no mínimo um derivado fluorescente de adenosina substituindo adenosina. Em uma modalidade preferencial o derivado fluorescente de adenosina é etenoadenosina.

Em uma modalidade adicional o complexo consistindo do derivado do ácido nucléico de acordo com a presente invenção e o SDF-1 é detectado usando fluorescência.

Em uma modalidade do método um sinal é criado na etapa (c) ou na etapa (d) e preferencialmente o sinal está correlacionado com a concentração de SDF-1 na amostra.

Em um aspecto preferencial, as provas podem ser realizadas em lâminas de 96 cavidades, onde os componentes são imobilizados nos vasos de reação conforme descrito acima e as cavidades agem como vasos de reação.

O ácido nucléico da invenção pode ser usado adicionalmente como matéria-prima para design de fármaco. Basicamente há duas abordagens possíveis. Uma abordagem é a triagem de bibliotecas de compostos visto que semelhantes bibliotecas de compostos são preferencialmente bibliotecas de compostos de baixo peso molecular. Em uma modalidade, a triagem é uma triagem de alta produtividade. Preferencialmente, triagem de alta produtividade é a avaliação de tentativa e erro rápida e eficiente de compostos em uma prova à base de alvo. No melhor caso as análises são realizadas por algumas medições colormáticas. Bibliotecas conforme usado em conexão com isso são de conhecimento de uma pessoa versada na técnica.

Alternativamente, o ácido nucléico de acordo com a presente invenção pode ser usado para design do fundamento racional de fármacos. Preferencialmente, design de fármaco racional é o design de uma estrutura de orientação farmacêutica. Iniciando a partir da estrutura tridimensional do alvo a qual é tipicamente identificada por métodos tais como cristalografia de raios X ou espectroscopia por ressonância magnética nuclear, programas de computador são usados para pesquisar através de bancos de dados conten-

do estruturas de muitos compostos químicos diferentes. A seleção é feita por um computador, os compostos identificados podem ser em seguida testados no laboratório.

O design racional de fármacos pode se iniciar a partir de quaisquer dos ácidos nucleicos de acordo com a presente invenção e envolve uma estrutura, preferencialmente uma estrutura tridimensional, a qual é similar à estrutura dos ácidos nucleicos da invenção ou idêntica às partes mediando ligação da estrutura dos ácidos nucleicos da invenção. Em qualquer caso semelhante estrutura ainda mostra a mesma característica de ligação ou uma característica de ligação similar aos ácidos nucleicos da invenção. Em quer uma etapa adicional ou como uma etapa alternativa no design racional de fármacos preferencialmente a estrutura tridimensional destas partes dos ácidos nucleicos ligando ao neurotransmissor são simuladas por grupamentos químicos os quais são diferentes de nucleotídeos e ácidos nucleicos. Por esta simulação pode ser desenhado um composto diferente dos ácidos nucleicos. O composto referido é preferencialmente uma molécula pequena ou um peptídeo.

Em caso de triagem de bibliotecas de compostos, tal como usando uma prova competitiva as quais são de conhecimento de uma pessoa versada nas artes, SDF-1 análogos, SDF-1 agonistas ou antagonistas de SDF-1 apropriados podem ser encontrados. As provas competitivas referidas podem ser estabelecidas como se segue. O ácido nucleico da invenção, preferencialmente um spiegelmero o qual é um L-ácido nucleico de ligação alvo, é ligado a uma fase sólida. De modo a identificar SDF-1 análogos marcados SDF-1 pode ser adicionado à prova. Um análogo potencial competiria com as moléculas de SDF-1 ligando ao spiegelmero o qual iria junto com uma redução no sinal obtido pela etiqueta respectiva. Triagem para agonistas ou antagonistas pode envolver o uso de uma prova de cultura celular conforme de conhecimento daqueles versados na técnica.

O kit de acordo com a presente invenção pode compreender no mínimo um ou vários dos ácidos nucleicos da invenção. Adicionalmente, o kit pode compreender no mínimo um ou vários controles positivos ou negativos.

Um controle positivo pode ser, por exemplo, SDF-1, particularmente o SDF-1 contra o qual o ácido nucléico da invenção é selecionado ou ao qual liga, preferencialmente, em forma líquida. Um controle negativo pode ser, por exemplo, um peptídeo o qual é definido em termos de propriedades biofísicas
5 similares a SDF-1, mas o qual não é reconhecido pelos ácidos nucléicos da invenção. Além disso, o kit referido pode compreender um ou vários tampões. Os vários ingredientes podem ser contidos no kit em forma seca ou liofilizada ou solvidos em um líquido. O kit pode compreender um ou vários recipientes os quais por sua vez podem conter um ou vários ingredientes do
10 kit. Em uma modalidade adicional, o kit compreende uma instrução ou folheto de instruções o qual proporciona ao usuário informação sobre como usar o kit e seus vários ingredientes.

Conforme preferencialmente usado aqui, neste requerimento de patente, o termo tratamento compreende em uma modalidade preferencial
15 adicionalmente ou alternativamente prevenção e/ou seguimento.

A determinação farmacêutica e bioanalítica do ácido nucléico de acordo com a presente invenção é elementarmente para a avaliação de seu perfil farmacocinético e biodinâmico em vários humores, tecidos e órgãos do corpo humano e não-humano. Para semelhante finalidade, podem ser usa-
20 dos quaisquer dos métodos de detecção revelados aqui, neste requerimento de patente, ou de conhecimento de uma pessoa versada na técnica. Em um aspecto adicional da presente invenção é proporcionada uma prova de hibridização de sanduíche para a detecção do ácido nucléico de acordo com a presente invenção. Dentro do teste de detecção são usadas uma sonda de
25 captura e uma sonda de detecção. A sonda de captura é complementar à primeira parte e a sonda de detecção à segunda parte do ácido nucléico de acordo com a presente invenção. Ambas, sonda de captura e de detecção, podem ser formadas por nucleotídeos de DNA, nucleotídeos de DNA modificados, nucleotídeos de RNA modificados, nucleotídeos de RNA, nucleotí-
30 deos de LNA e/ou nucleotídeos de PNA.

Portanto, a sonda de captura compreende um trecho de sequência complementar à extremidade 5' do ácido nucléico de acordo com a pre-

sente invenção e a sonda de detecção compreende um trecho de sequência complementar à extremidade 3' do ácido nucléico de acordo com a presente invenção. Neste caso a sonda de captura é imobilizada para uma superfície ou matriz através de sua extremidade 5' por meio da qual a sonda de captura pode ser imobilizada diretamente em sua extremidade 5' ou através de um encadeador entre sua extremidade 5' e a superfície ou matriz. No entanto, em princípio o encadeador pode ser encadeado a cada nucleotídeo da sonda de captura. O encadeador pode ser formado por encadeadores hidrofílicos de versados na técnica ou por nucleotídeos de D-DNA, nucleotídeos de D-DNA modificados, nucleotídeos de D-RNA, nucleotídeos de D-RNA modificados, nucleotídeos de D-LNA, nucleotídeos de PNA, nucleotídeos de L-RNA, nucleotídeos de L-DNA, nucleotídeos de L-RNA modificados, nucleotídeos de L-DNA modificados e/ou nucleotídeos de L-LNA.

Alternativamente, a sonda de captura compreende um trecho de sequência complementar à extremidade 3' do ácido nucléico de acordo com a presente invenção e a sonda de detecção compreende um trecho de sequência complementar à extremidade 5' do ácido nucléico de acordo com a presente invenção. Neste caso a sonda de captura é imobilizada para uma superfície ou matriz através de sua extremidade 3' por meio da qual a sonda de captura pode ser imobilizada diretamente em sua extremidade 3' ou através de um encadeador entre sua extremidade 3' e a superfície ou matriz. No entanto, em princípio, o encadeador pode ser encadeado a cada nucleotídeo do trecho da sequência que é complementar ao ácido nucléico de acordo com a presente invenção. O encadeador pode ser formado por encadeadores hidrofílicos de versados na técnica ou por nucleotídeos de D-DNA, nucleotídeos de D-DNA modificados, nucleotídeos de D-RNA, nucleotídeos de D-RNA modificados, nucleotídeos de D-LNA, nucleotídeos de PNA, nucleotídeos de L-RNA, nucleotídeos de L-DNA, nucleotídeos de L-RNA modificados, nucleotídeos de L-DNA modificados e/ou nucleotídeos de L-LNA.

O número de nucleotídeos da sonda de captura e detecção que podem hibridizar ao ácido nucléico de acordo com a presente invenção é variável e pode ser dependente do número de nucleotídeos da sonda de

captura e/ou detecção e/ou o próprio ácido nucléico de acordo com a presente invenção. O número total de nucleotídeos da sonda de captura e de detecção que podem hibridizar ao ácido nucléico de acordo com a presente invenção deve ser máximo o número de nucleotídeos que são compreendidos pelo ácido nucléico de acordo com a presente invenção. O número mínimo de nucleotídeos (2 a 10 nucleotídeos) da sonda de detecção e captura deve permitir hibridização à extremidade 5' ou à extremidade 3', respectivamente, do ácido nucléico de acordo com a presente invenção. De modo a realizar alta especificidade e seletividade entre o ácido nucléico de acordo com a presente invenção e outros ácidos nucléicos ocorrendo em amostras que são analisadas o número total de nucleotídeos da sonda de captura e detecção deve ser ou máximo o número de nucleotídeos que são compreendidos pelo ácido nucléico de acordo com a presente invenção.

Além disso a sonda de detecção preferencialmente carrega uma molécula de marcador ou etiqueta que pode ser detectada conforme previamente descrito aqui, neste requerimento de patente. A molécula de marcador ou etiqueta pode em princípio ser encadeada a cada nucleotídeo da sonda de detecção. Preferencialmente, a etiqueta ou marcador está localizada na extremidade 5' ou na extremidade 3' da sonda de detecção, por meio da qual entre os nucleotídeos dentro da sonda de detecção que são complementares ao ácido nucléico de acordo com a presente invenção, e a etiqueta pode ser inserido um encadeador. O encadeador pode ser formado por encadeadores hidrofílicos dos versados na técnica ou por nucleotídeos de D-DNA, nucleotídeos de D-DNA modificados, nucleotídeos de D-RNA, nucleotídeos de D-RNA modificados, nucleotídeos de D-LNA, nucleotídeos de PNA, nucleotídeos de L-RNA, nucleotídeos de L-DNA, nucleotídeos de L-RNA modificados, nucleotídeos de L-DNA modificados e/ou nucleotídeos de L-LNA.

A detecção do ácido nucléico de acordo com a presente invenção pode ser realizada como se segue:

O ácido nucléico de acordo com a presente invenção hibridiza com uma de suas extremidades à sonda de captura e com a outra extremi-

dade à sonda de detecção. Depois disso a sonda de detecção não ligada é removida, por exemplo, por uma ou várias etapas de lavagem. A quantidade de sonda de detecção ligada a qual preferencialmente carrega uma molécula de marcador ou etiqueta, pode ser medida em seguida.

5 Conforme preferencialmente usado aqui, neste requerimento de patente, os termos doença e distúrbio serão usados em uma maneira intercambiável, caso não indicado ao contrário.

Conforme usado aqui, neste requerimento de patente, o termo compreendem preferencialmente não pretende limitar o temo seguido ou descrito por semelhante termo. No entanto, em uma modalidade alternativa o termo compreende será entendido no significado de contendo e portanto como limitando o tema seguido ou descrito por semelhante termo.

10 As várias SEQ. ID. Nos., a natureza química das moléculas de ácido nucléico de acordo com a presente invenção e as moléculas SDF-1 alvo conforme usado aqui, neste requerimento de patente, a real seqüência das mesmas e o número de referência interno são resumidos na tabela seguinte.

Também foi observado que os ácidos nucléicos foram caracterizados no nível de aptâmero, isto é, D-ácido nucléico (D-RNA) com o D-SDF-1 humano biotinilado (SEQ.ID. 4) ou no nível de Spiegelmero, isto é, L-ácido nucléico (L-RNA) com a configuração natural de SDF-1, o L- SDF-1 (SDF-1 α humano, SEQ-ID. 1). Os diferentes ácidos nucléicos compartilham um nome de referência interno mas uma SEQ. ID para a molécula de D-RNA (Aptâmero) e uma SEQ. ID. para a molécula de L-RNA (Spiegelmero), respectivamente.

TABELA 1 (A)

Seq.-ID	RNA/Peptídeo	Seqüência	Referência Interna
1	L-peptídeo	KPVSLSYRCPCRFFESH VARANVKHLKILNTPNCA LQIVARLKNNNRQV- CIDPKLKWIQEYLE- KALNK	SDF-1 α humano / de macaco / de gato SDF-1 humano / de macaco / de gato

2	L-peptídeo	KPVSLSYRCPCRFFESH VARANVKHLKILNTPNCA LQIVARLKNNNRQV- CIDPKLKWIQEYLE- KALNKRFKM	SDF-1 β humano / de macaco / de gato
3	L-peptídeo	KPVSLSYRCPCRFFESHI ARANVKHLKILNTPNCAL QIVARLKNNNRQVCIDP- KLKWIQEYLEKALNK	SDF-1 α murino SDF-1 murino
4	D-peptídeo	KPVSLSYRCPCRFFESH VARANVKHLKILNTPNCA LQIVARLKNNNRQV- CIDPKLKWIQEYLE- KALNKRFK-Biotin	D-SDF-1 hu biotini- lado
5	L-RNA (SPIE- GELMER)	GCUGUGAAAGCAA- CAUGUCAAUGAAAG- GUAGCCGCAGC	192-A10-001
6	L-RNA (SPIE- GELMER)	GCUGUGAAAGUAA- CAUGUCAAUGAAAG- GUAACACAGC	192-G10
7	L-RNA (SPIE- GELMER)	GCUGUGAAAGUAA- CACGUCAAUGAAAG- GUAACCGCAGC	192-F10
8	L-RNA (SPIE- GELMER)	GCUGUGAAAGUAA- CACGUCAAUGAAAG- GUAACACAGC	192-B11
9	L-RNA (SPIE- GELMER)	GCUGUAAAAGUAA- CAUGUCAAUGAAAG- GUAACUACAGC	192-C9
10	L-RNA (SPIE- GELMER)	GCUGUAAAAGUAACA- AGUCAAUGAAAGGUA- ACUACAGC	192-E10

11	L-RNA (SPIE-GELMER)	GCUGUGAAAGUAA- AGUCA AUGAAAGGUA- ACCACAGC	192-C10
12	L-RNA (SPIE-GELMER)	GCAGUGAAAGUAA- CAUGUCA AUGAAAG- GUAACCACAGC	192-D11
13	L-RNA (SPIE-GELMER)	GCUGUGAAAGUAA- CAUGUCA AUGAAAG- GUAACCACUGC	192-G11
14	L-RNA (SPIE-GELMER)	GCUAUGAAAGUAA- CAUGUCA AUGAAAG- GUAACCAUAGC	192-H11
15	L-RNA (SPIE-GELMER)	GCUGCGAAAGCGA- CAUGUCA AUGAAAG- GUAGCCGCAGC	192-D10
16	L-RNA (SPIE-GELMER)	GCUGUGAAAGCAA- CAUGUCA AUGAAAG- GUAGCCACAGC	192-E9
17	L-RNA (SPIE-GELMER)	GCUGUGAAAGUAA- CAUGUCA AUGAAAG- GUAGCCGCAGC	192-H9

TABELA 1 (B)

Seq.-ID	RNA/Peptídeo	Seqüência	Referência Interna
18	L-RNA (SPIE-GELMER)	AGCGUGAAAGUAA- CACGUAAAAUGAAAG- GUAACCACGCU	191-A6
19	L-RNA (SPIE-GELMER)	AAAGYRACAHGUMAA- X_A UGAAAGGUARC; X_A = A ou ausente	Fórmula-1 Tipo A
20	L-RNA (SPIE-GELMER)	AAAGYRACAHGUMA- AUGAAAGGUARC	Fórmula-2 Tipo A
21	L-RNA (SPIE-	AAAGYRACAHGUMAA-	Fórmula-3 Tipo A

	GELMER)	AUGAAAGGUARC	
22	L-RNA (SPIE- GELMER)	AAAGYAACAUGUCA- AUGAAAGGUARC	Fórmula-4 Tipo A
23	L-RNA (SPIE- GELMER)	RSHRYR	Fórmula-5-5' Tipo A
24	L-RNA (SPIE- GELMER)	YRYDSY	Fórmula-5-3' Tipo A
25	L-RNA (SPIE- GELMER)	CUGUGAAAGCAACAU- GUCAAUGAAAG- GUAGCCGCAG	192-A10-002
26	L-RNA (SPIE- GELMER)	UGUGAAAGCAACAU- GUCAAUGAAAG- GUAGCCGCA	192-A10-003
27	L-RNA (SPIE- GELMER)	GUGAAAGCAACAUGU- CAAUGAAAG- GUAGCCGC	192-A10-004
28	L-RNA (SPIE- GELMER)	UGAAAGCAACAUGU- CAAUGAAAGGUAGCCG	192-A10-005
29	L-RNA (SPIE- GELMER)	GAAAGCAACAUGUCA- AUGAAAGGUAGCC	192-A10-006
30	L-RNA (SPIE- GELMER)	AAAGCAACAUGUCA- AUGAAAGGUAGC	192-A10-007
31	L-RNA (SPIE- GELMER)	GCGUGAAAGCAACAU- GUCAAUGAAAG- GUAGCCGCGC	192-A10-008
32	L-RNA (SPIE- GELMER)	GCGCGAAAGCAACAU- GUCAAUGAAAG- GUAGCCGCGC	192-A10-015
33	L-RNA (SPIE- GELMER)	GCGGAAAGCAACAU- GUCAAUGAAAG- GUAGCCCGC	192-A10-014
34	L-RNA (SPIE- GELMER)	CGUGAAAGCAACAU-	192-A10-016

	GELMER)	GUCAAUGAAAG- GUAGCCGCG	
35	L-RNA (SPIE- GELMER)	GCGCAAAGCAACAU- GUCAAUGAAAG- GUAGCGUGC	192-A10-017
36	L-RNA (SPIE- GELMER)	GUGCAAAGCAACAU- GUCAAUGAAAG- GUAGCGCGC	192-A10-018

TABELA 1 (C)

Seq.-ID	RNA/Peptídeo	Seqüência	Referência Interna
37	L-RNA (SPIE- GELMER)	CGCGAAAGCAACAU- GUCAAUGAAAG- GUAGCCGUG	192-A10-019
38	L-RNA (SPIE- GELMER)	GGGCAAAGCAACAU- GUCAAUGAAAG- GUAGCGCCC	192-A10-020
39	L-RNA (SPIE- GELMER)	GGCCAAAGCAACAU- GUCAAUGAAAG- GUAGCGGCC	192-A10-021
40	L-RNA (SPIE- GELMER)	GCCCAAAGCAACAU- GUCAAUGAAAG- GUAGCGGGC	192-A10-022
41	L-RNA (SPIE- GELMER)	CCCCAAAGCAACAU- GUCAAUGAAAG- GUAGCGGGG	192-A10-023
42	L-RNA (SPIE- GELMER)	X_2 BBBS; X_2 = S ou au- sente	Fórmula-6-5' Tipo A
43	L-RNA (SPIE- GELMER)	SBBV X_3 ; X_3 = S ou ausen- te	Fórmula-6-3' Tipo A
44	L-RNA (SPIE- GELMER)	X_1X_2 NNBV; X_1 = R ou au- sente, X_2 = S ou ausente	Fórmula-7-5' Tipo A
45	L-RNA (SPIE- GELMER)	BNBN X_3X_4 ; X_3 = R ou au-	Fórmula-7-3' Tipo

	GELMER)	sente, $X_4 = Y$ ou ausente	A
46	L-RNA (SPIE-GELMER)	AGCGUGGUGUGAUCUA GAUGUAGUGGCU- GAUCCUAGUCAG- GUACGCU	193-C2-001
47	L-RNA (SPIE-GELMER)	AGCGUGGUGUGAUCUA GAUGUAUUGGCU- GAUCCUAGUCAG- GUACGCU	193-G2-001
48	L-RNA (SPIE-GELMER)	AGCGUGGUGUGAUCUA GAUGUAAUGGCU- GAUCCUAGUCAG- GUGCGCU	193-F2-001
49	L-RNA (SPIE-GELMER)	GCGAGGUGUGAUCUAG AUGUAGUGGCUGAUC- CUAGUCAGGUGCGC	193-G1-002
50	L-RNA (SPIE-GELMER)	GCGUGGUGUGAUCUAG AUGUAGUGGCUGAUC- CUAGUCAGGUGCGC	193-D2-002
51	L-RNA (SPIE-GELMER)	GCAUGGUGUGAUCUAG AUGUAGUGGCUGAUC- CUAGUCAGGUGCCC	193-A1-002
52	L-RNA (SPIE-GELMER)	GCGUGGUGUGAUCUAG AUGUAAUGGCUGAUC- CUAGUCAGGGACGC	193-D3-002

TABELA 1 (D)

Seq.-ID	RNA/Peptídeo	Seqüência	Referência Interna
53	L-RNA (SPIE-GELMER)	GCGUGGUGUGAUCUAG AUGUAGAGGCUGAUC- CUAGUCAGGUACGC	193-B3-002
54	L-RNA (SPIE-GELMER)	GCGUGGUGUGAUCUAG AUGUAAAGGCUGAUC-	193-H3-002

		CUAGUCAGGUACGC	
55	L-RNA (SPIE-GELMER)	GCGUGGUGUGAUCUAG AUGUAGUGGCUGUUC- CUAGUCAGGUAUGC	193-E3-002
56	L-RNA (SPIE-GELMER)	GCGUGGUGUGAUCUAG AUGUAGUGGCUGAUC- CUAGUUAGGUACGC	193-D1-002
57	L-RNA (SPIE-GELMER)	GUGUGAUCUAGAU- GUADWGGCUGWUC- CUAGUYAGG	Fórmula-1 Tipo B
58	L-RNA (SPIE-GELMER)	GUGUGAUCUAGAU- GUADUGGCUGAUCCU- AGUCAGG	Fórmula-2 Tipo B
59	L-RNA (SPIE-GELMER)	X_1 GCRWG; X_1 = A ou au- sente	Fórmula-3-5' Tipo B
60	L-RNA (SPIE-GELMER)	KRYSCX ₄ ; X ₄ = U ou au- sente	Fórmula-3-3' Tipo B
61	L-RNA (SPIE-GELMER)	GCGUGGUGUGAUCUAG AUGUAGUGGCUGAUC- CUAGUCAGGUACGC	193-C2-002
62	L-RNA (SPIE-GELMER)	CGUGGUGUGAUCUA- GAUGUAGUGGCU- GAUCCUAGUCAG- GUACG	193-C2-003
63	L-RNA (SPIE-GELMER)	GUGGUGUGAUCUA- GAUGUAGUGGCU- GAUCCUAGUCAGGUAC	193-C2-004
64	L-RNA (SPIE-GELMER)	UGGUGUGAUCUAGAU- GUAGUGGCUGAUCCU- AGUCAGGUA	193-C2-005
65	L-RNA (SPIE-GELMER)	GGUGUGAUCUAGAU- GUAGUGGCUGAUCCU-	193-C2-006

		AGUCAGGU	
66	L-RNA (SPIE-GELMER)	GUGUGAUCUAGAU-GUAGUGGCUGAUCCU-AGUCAGG	193-C2-007
67	L-RNA (SPIE-GELMER)	GCGUGGUGUGAUCUAG AUGUAUUGGCUGAUC-CUAGUCAGGUACGC	193-G2-012

TABELA 1 (E)

Seq.-ID	RNA/Peptídeo	Seqüência	Referência Interna
68	L-RNA (SPIE-GELMER)	GCGCGGUGUGAUCUAG AUGUAUUGGCUGAUC-CUAGUCAGGCGCGC	193-G2-013
69	L-RNA (SPIE-GELMER)	GCGCGUGUGAUCUA-GAUGUAUUGGCU-GAUCCUAGU-CAGGGCGC	193-G2-014
70	L-RNA (SPIE-GELMER)	GGGCGUGUGAUCUA-GAUGUAUUGGCU-GAUCCUAGU-CAGGGCCC	193-G2-015
71	L-RNA (SPIE-GELMER)	GGCCGUGUGAUCUA-GAUGUAUUGGCU-GAUCCUAGU-CAGGGGCC	193-G2-016
72	L-RNA (SPIE-GELMER)	GCCCGUGUGAUCUA-GAUGUAUUGGCU-GAUCCUAGU-CAGGGGGC	193-G2-017
73	L-RNA (SPIE-GELMER)	X_2 SSBS; $X_2 = G$ ou ausente	Fórmula-4-5' Tipo B
74	L-RNA (SPIE-GELMER)	BVSS X_3 ; $X_3 = C$ ou ausente	Fórmula-4-3' Tipo B

75	L-RNA (SPIE-GELMER)	X_1 GCGUG; X_1 = A ou ausente	Fórmula-5-5' Tipo B
76	L-RNA (SPIE-GELMER)	UACGCX ₄ ; X ₄ = U ou ausente	Fórmula-5-3' Tipo B
77	L-RNA (SPIE-GELMER)	X_1X_2 SVNS; X_1 = A ou ausente, X_2 = G ou ausente	Fórmula-6-5' Tipo B
78	L-RNA (SPIE-GELMER)	BVBSX ₃ X ₄ ; X ₃ = C ou ausente, X ₄ = U ou ausente	Fórmula-6-3' Tipo B
79	L-RNA (SPIE-GELMER)	GUGCUGCGGGGGUU- AGGGCUAGAA- GUCGGCCUGCAGCAC	197-B2
80	L-RNA (SPIE-GELMER)	AGCGUGGCGAGGUU- AGGGCUAGAAGUCG- GUCGACACGCU	191-D5-001
81	L-RNA (SPIE-GELMER)	GUGUUGCGGAGGUU- AGGGCUAGAAGUCG- GUCAGCAGCAC	197-H1
82	L-RNA (SPIE-GELMER)	CGUGCGCUUGAGAUAG GGGUUAGGGCUUAAA- GUCGGCUGAUUCU- CACG	190-A3-001
83	L-RNA (SPIE-GELMER)	AGCGUGAAGGGGUU- AGGGCUCGAAGUCGG- CUGACACGCU	191-A5

TABELA 1 (F)

Seq.-ID	RNA/Peptídeo	Seqüência	Referência Interna
84	L-RNA (SPIE-GELMER)	GUGCUGCGGGGGUU- AGGGCUCGAA- GUCGGCCCCGCAGCAC	197-H3
85	L-RNA (SPIE-GELMER)	GUGUUCCCGGGGUU- AGGGCUUGAA- GUCGGCCGGCAGCAC	197-B1

86	L-RNA (SPIE-GELMER)	GUGUUGCAGGGGUU- AGGGCUUGAA- GUCGGCCUGCAGCAC	197-E3
87	L-RNA (SPIE-GELMER)	GUGCUGCGGGGGU- AGGGCUCAA- GUCGGCCUGCAGCAC	197-H2
88	L-RNA (SPIE-GELMER)	GUGCUGCCGGGGU- AGGGCUAA- AGUCGGCCGACAGCAC	197-D1
89	L-RNA (SPIE-GELMER)	GUGCUGUGGGGGU- CAGGGCUAGAA- GUCGGCCUGCAGCAC	197-D2
90	L-RNA (SPIE-GELMER)	GGUYAGGGCUHRX _A A- GUCGG; X _A = A ou au- sente	Fórmula-1 Tipo C
91	L-RNA (SPIE-GELMER)	GGUYAGGGCUHRAA- GUCGG	Fórmula-2 Tipo C
92	L-RNA (SPIE-GELMER)	GGUYAGGGCUHRA- GUCGG	Fórmula-3 Tipo C
93	L-RNA (SPIE-GELMER)	GGUUAGGGCUHGAA- GUCGG	Fórmula-4 Tipo C
94	L-RNA (SPIE-GELMER)	UGAGAUAGGGGUU- AGGGCUUAAAGUCGG- CUGAUUCUCA	190-A3-003
95	L-RNA (SPIE-GELMER)	GAGAUAGGGGUU- AGGGCUUAAAGUCGG- CUGAUUCUC	190-A3-004
96	L-RNA (SPIE-GELMER)	GGGGUUAGGGCUUAA- AGUCGGCUGAUUCU	190-A3-007
97	L-RNA (SPIE-GELMER)	GCGUGGCGAGGUU- AGGGCUAGAAGUCG- GUCGACACGC	191-D5-002

98	L-RNA (SPIE-GELMER)	CGUGGCGAGGUU- AGGGCUAGAAGUCG- GUCGACACG	191-D5-003
99	L-RNA (SPIE-GELMER)	CGGGCGAGGUU- AGGGCUAGAAGUCG- GUCGACCG	191-D5-004
100	L-RNA (SPIE-GELMER)	CGGGCGAGGUU- AGGGCUAGAAGUCG- GUCGCCCG	191-D5-005

TABELA 1 (G)

Seq.-ID	RNA/Peptídeo	Seqüência	Referência Interna
101	L-RNA (SPIE-GELMER)	CGGCGAGGUUAGGG- CUAGAAGUCG- GUCGCCG	191-D5-006
102	L-RNA (SPIE-GELMER)	CGGGAGGUUAGGGCU- AGAAGUCGGUCCCG	191-D5-007
103	L-RNA (SPIE-GELMER)	GGGAGGUUAGGGCU- AGAAGUCGGUCCC	191-D5-010
104	L-RNA (SPIE-GELMER)	CCGCGGUUAGGGCUA- GAAGUCGGGCGG	191-D5-017
105	L-RNA (SPIE-GELMER)	CCCGGGUUAGGGCUA- GAAGUCGGGCGG	191-D5-029
106	L-RNA (SPIE-GELMER)	GGCGGGUUAGGGCU- AGAAGUCGGCGCC	191-D5-024
107	L-RNA (SPIE-GELMER)	CCCGCGGUUAGGGCU- AGAAGUCGGGCGGG	191-D5-017-29a
108	L-RNA (SPIE-GELMER)	GCCGCGGUUAGGGCU- AGAAGUCGGGCGGC	191-D5-017-29b
109	L-RNA (SPIE-GELMER)	CCCGGGGUUAGGGCU- AGAAGUCGGGCGGG	191-D5-019-29a
110	L-RNA (SPIE-GELMER)	CGGCGGGUUAGGG- CUAGAAGUCGGCGCCG	191-D5-024-29a

111	L-RNA (SPIE-GELMER)	GGGCGGGUUAGGG-CUAGAAGUCGGCGCCC	191-D5-024-29b
112	L-RNA (SPIE-GELMER)	UGCUGCGGGGGUU-AGGGCUAGAA-GUCGGCCUGCAGCA	197-B2-001
113	L-RNA (SPIE-GELMER)	GCUGCGGGGGUU-AGGGCUAGAA-GUCGGCCUGCAGC	197-B2-002
114	L-RNA (SPIE-GELMER)	CUGCGGGGGUU-AGGGCUAGAA-GUCGGCCUGCAG	197-B2-003
115	L-RNA (SPIE-GELMER)	UGC GGGGGUUAGGG-CUAGAAGUCGGCCUG-CA	197-B2-004
116	L-RNA (SPIE-GELMER)	GCGGGGGUUAGGG-CUAGAAGUCGGCCUGC	197-B2-005

TABELA 1 (H)

Seq.-ID	RNA/Peptídeo	Seqüência	Referência Interna
117	L-RNA (SPIE-GELMER)	GCCGGGGUUAGGG-CUAGAAGUCGGCCGGC	197-B2-006
118	L-RNA (SPIE-GELMER)	GGCCGGGGUUAGGG-CUAGAA-GUCGGCCGGCC	197-B2-006-31a
119	L-RNA (SPIE-GELMER)	CGCCGGGGUUAGGG-CUAGAA-GUCGGCCGGCG	197-B2-006-31b
120	L-RNA (SPIE-GELMER)	RKSBUSNVGR	Fórmula-5-5' Tipo C
121	L-RNA (SPIE-GELMER)	YYNRCASSMY	Fórmula-5-3' Tipo C
122	L-RNA (SPIE-GELMER)	RKSBUGSVGR	Fórmula-6-5' Tipo C

123	L-RNA (SPIE-GELMER)	YCNRCASSMY	Fórmula-6-3' Tipo C
124	L-RNA (SPIE-GELMER)	X _s SSSV; X _s = S ou ausente	Fórmula-7-5' Tipo C
125	L-RNA (SPIE-GELMER)	BSSSX _s ; X _s = S ou ausente	Fórmula-7-3' Tipo C
126	L-RNA (SPIE-GELMER)	SGGSV	Fórmula-8-5' Tipo C
127	L-RNA (SPIE-GELMER)	YSCCS	Fórmula-8-3' Tipo C
128	L-RNA (SPIE-GELMER)	GCSGG	Fórmula-9-5' Tipo C
129	L-RNA (SPIE-GELMER)	CCKGC	Fórmula-9-3' Tipo C
130	L-RNA (SPIE-GELMER)	SSSSR	Fórmula-10-5' Tipo C
131	L-RNA (SPIE-GELMER)	YSBSS	Fórmula-10-3' Tipo C

TABELA 1 (I)

Seq.-ID	RNA/Peptídeo	Sequência	Referência Interna
132	L-RNA (SPIE-GELMER)	5'-40 kDa-PEG-GCGUGGUGUGAUCUAG AUGUAUUGGCUGAUC-CUAGUCAGGUACGC	193-G2-012-5'-PEG
133	L-RNA (SPIE-GELMER)	5'-40 kDa-PEG-GCGUGAAAGCAACAU-GUCAAUGAAAG-GUAGCCGCGC	192-A10-008-5'-PEG
134	L-RNA (SPIE-GELMER)	5'-40 kDa-PEG-CGGGAGGUUAGGGCU-AGAAGUCGGUCCCG	191-D5-007-5'-PEG
135	L-RNA (SPIE-GELMER)	5'-40 kDa-PEG-	197-B2-006-5'-

	GELMER)	GCCGGGGUUAGGG- CUAGAAGUCGGCCGGC	PEG
136	L-RNA (SPIE- GELMER)	5'-40 kDa-PEG- CGCCGGGGUUAGGG- CUAGAA- GUCGGCCGGCG	197-B2-006-31b- 5'PEG
137	L-RNA (SPIE- GELMER)	5'-40 kDa-PEG- GCUGUGAAAGCAA- CAUGUCAAAUGAAAG- GUAGCCGCAGC	192-A10-001-5'- PEG 192-A10-001-5'- PEG40
138	L-RNA (SPIE- GELMER)	UAAGGAAACUCGGU- CUGAUGCGGUAGCG- CUGUGCAGAGCU	Spiegelmero Con- trole
139	L-RNA (SPIE- GELMER)	5'-30 kDa-PEG- GCUGUGAAAGCAA- CAUGUCAAAUGAAAG- GUAGCCGCAGC	192-A10-001-5'- PEG30
140	L-RNA (SPIE- GELMER)	5'-100 kDa-HES- GCUGUGAAAGCAA- CAUGUCAAAUGAAAG- GUAGCCGCAGC	192-A10-001-5'- HES100
141	L-RNA (SPIE- GELMER)	5'-130 kDa-HES- GCUGUGAAAGCAA- CAUGUCAAAUGAAAG- GUAGCCGCAGC	192-A10-001-5'- HES130
142	L-RNA (SPIE- GELMER)	CGUGGUCCGUUGUGU CAGGUCU- AUUCGCCCCGGUG- CAGGGCAUCCGCG	194-A2-001
143	L-RNA (SPIE- GELMER)	GCAGUGUGACGCGGAC GUGAUAGGACAGAG- CUGAUCCCCGCUCAG-	196-B12-003

		GUGAG	
144	L-RNA (SPIE- GELMER)	CAACAGCAGUGUGACG CGGACGUGAUAGGA- CAGAGCUGAUCCCG- CUCAG	196-B12-004

TABELA 1 (J)

Seq.-ID	RNA/Peptídeo	Seqüência	Referência Interna
145	D-RNA (AP- TÂMERO)	GCUGUGAAAGCAA- CAUGUCA AUGAAAG- GUAGCCGCAGC	192-A10-001
146	D-RNA (AP- TÂMERO)	GCUGUGAAAGUAA- CAUGUCA AUGAAAG- GUAACCACAGC	192-G10
147	D-RNA (AP- TÂMERO)	GCUGUGAAAGUAA- CACGUCAAUGAAAG- GUAACCGCAGC	192-F10
148	D-RNA (AP- TÂMERO)	GCUGUGAAAGUAA- CACGUCAAUGAAAG- GUAACCACAGC	192-B11
149	D-RNA (AP- TÂMERO)	GCUGUAAAAGUAA- CAUGUCA AUGAAAG- GUAACUACAGC	192-C9
150	D-RNA (AP- TÂMERO)	GCUGUAAAAGUAACA- AGUCA AUGAAAGGUA- ACUACAGC	192-E10
151	D-RNA (AP- TÂMERO)	GCUGUGAAAGUAACA- AGUCA AUGAAAGGUA- ACCACAGC	192-C10
152	D-RNA (AP- TÂMERO)	GCAGUGAAAGUAA- CAUGUCA AUGAAAG- GUAACCACAGC	192-D11
153	D-RNA (AP- TÂMERO)	GCUGUGAAAGUAA-	192-G11

	TÂMERO)	CAUGUCA AUGAAAG- GUAACCA CUGC	
154	D-RNA (AP- TÂMERO)	GCUAUGAAAGUAA- CAUGUCA AUGAAAG- GUAACCAUAGC	192-H11
155	D-RNA (AP- TÂMERO)	GCUGCGAAAGCGA- CAUGUCA AUGAAAG- GUAGCCGCAGC	192-D10
156	D-RNA (AP- TÂMERO)	GCUGUGAAAGCAA- CAUGUCA AUGAAAG- GUAGCCACAGC	192-E9
157	D-RNA (AP- TÂMERO)	GCUGUGAAAGUAA- CAUGUCA AUGAAAG- GUAGCCGCAGC	192-H9
158	D-RNA (AP- TÂMERO)	AGCGUGAAAGUAA- CACGUAAAAUGAAAG- GUAACCA CGCU	191-A6
159	D-RNA (AP- TÂMERO)	CUGUGAAAGCAACAU- GUCAAUGAAAG- GUAGCCGCAG	192-A10-002
160	D-RNA (AP- TÂMERO)	UGUGAAAGCAACAU- GUCAAUGAAAG- GUAGCCGCA	192-A10-003

TABELA 1 (K)

Seq.-ID	RNA/Peptídeo	Seqüência	Referência Interna
161	D-RNA (AP- TÂMERO)	GUGAAAGCAACAUGU- CAAUGAAAG- GUAGCCGC	192-A10-004
162	D-RNA (AP- TÂMERO)	UGAAAGCAACAUGU- CAAUGAAAGGUAGCCG	192-A10-005
163	D-RNA (AP- TÂMERO)	GAAAGCAACAUGUCA- AUGAAAGGUAGCC	192-A10-006

164	D-RNA (AP-TÂMERO)	AAAGCAACAUGUCA-AUGAAAGGUAGC	192-A10-007
165	D-RNA (AP-TÂMERO)	GCGUGAAAGCAACAU-GUCAAUGAAAG-GUAGCCGCGC	192-A10-008
166	D-RNA (AP-TÂMERO)	GCGCGAAAGCAACAU-GUCAAUGAAAG-GUAGCCGCGC	192-A10-015
167	D-RNA (AP-TÂMERO)	GCGGAAAGCAACAU-GUCAAUGAAAG-GUAGCCCGC	192-A10-014
168	D-RNA (AP-TÂMERO)	CGUGAAAGCAACAU-GUCAAUGAAAG-GUAGCCGCG	192-A10-016
169	D-RNA (AP-TÂMERO)	GCGCAAAGCAACAU-GUCAAUGAAAG-GUAGCGUGC	192-A10-017
170	D-RNA (AP-TÂMERO)	GUGCAAAGCAACAU-GUCAAUGAAAG-GUAGCGCGC	192-A10-018
171	D-RNA (AP-TÂMERO)	CGCGAAAGCAACAU-GUCAAUGAAAG-GUAGCCGUG	192-A10-019
172	D-RNA (AP-TÂMERO)	GGGCAAAGCAACAU-GUCAAUGAAAG-GUAGCGCCC	192-A10-020
173	D-RNA (AP-TÂMERO)	GGCCAAAGCAACAU-GUCAAUGAAAG-GUAGCGGCC	192-A10-021
174	D-RNA (AP-TÂMERO)	GCCCAAAGCAACAU-GUCAAUGAAAG-GUAGCGGGC	192-A10-022

175	D-RNA (AP-TÂMERO)	CCCCAAAGCAACAU-GUCAAUGAAAG-GUAGCGGGG	192-A10-023
176	D-RNA (AP-TÂMERO)	AGCGUGGUGUGAUCUA GAUGUAGUGGCU-GAUCCUAGUCAG-GUACGCU	193-C2-001

TABELA 1 (L)

Seq.-ID	RNA/Peptídeo	Seqüência	Referência Interna
177	D-RNA (AP-TÂMERO)	AGCGUGGUGUGAUCUA GAUGUAUUGGCU-GAUCCUAGUCAG-GUACGCU	193-G2-001
178	D-RNA (AP-TÂMERO)	AGCGUGGUGUGAUCUA GAUGUAAUGGCU-GAUCCUAGUCAG-GUGCGCU	193-F2-001
179	D-RNA (AP-TÂMERO)	GCGAGGUGUGAUCUAG AUGUAGUGGCUGAUC-CUAGUCAGGUGCGC	193-G1-002
180	D-RNA (AP-TÂMERO)	GCGUGGUGUGAUCUAG AUGUAGUGGCUGAUC-CUAGUCAGGUGCGC	193-D2-002
181	D-RNA (AP-TÂMERO)	GCAUGGUGUGAUCUAG AUGUAGUGGCUGAUC-CUAGUCAGGUGCCC	193-A1-002
182	D-RNA (AP-TÂMERO)	GCGUGGUGUGAUCUAG AUGUAAUGGCUGAUC-CUAGUCAGGGACGC	193-D3-002
183	D-RNA (AP-TÂMERO)	GCGUGGUGUGAUCUAG AUGUAGAGGCUGAUC-CUAGUCAGGUACGC	193-B3-002

184	D-RNA (AP-TÂMERO)	GCGUGGUGUGAUCUAG AUGUAAAGGCUGAUC- CUAGUCAGGUACGC	193-H3-002
185	D-RNA (AP-TÂMERO)	GCGUGGUGUGAUCUAG AUGUAGUGGCUGUUC- CUAGUCAGGUAUGC	193-E3-002
186	D-RNA (AP-TÂMERO)	GCGUGGUGUGAUCUAG AUGUAGUGGCUGAUC- CUAGUUAGGUACGC	193-D1-002
187	D-RNA (AP-TÂMERO)	GCGUGGUGUGAUCUAG AUGUAGUGGCUGAUC- CUAGUCAGGUACGC	193-C2-002
188	D-RNA (AP-TÂMERO)	CGUGGUGUGAUCUA- GAUGUAGUGGCU- GAUCCUAGUCAG- GUACG	193-C2-003
189	D-RNA (AP-TÂMERO)	GUGGUGUGAUCUA- GAUGUAGUGGCU- GAUCCUAGUCAGGUAC	193-C2-004
190	D-RNA (AP-TÂMERO)	UGGUGUGAUCUAGAU- GUAGUGGCUGAUCCU- AGUCAGGUA	193-C2-005
191	D-RNA (AP-TÂMERO)	GGUGUGAUCUAGAU- GUAGUGGCUGAUCCU- AGUCAGGU	193-C2-006

TABELA 1 (M)

Seq.-ID	RNA/Peptídeo	Seqüência	Referência Interna
192	D-RNA (AP-TÂMERO)	GUGUGAUCUAGAU- GUAGUGGCUGAUCCU- AGUCAGG	193-C2-007
193	D-RNA (AP-TÂMERO)	GCGUGGUGUGAUCUAG AUGUAUUGGCUGAUC-	193-G2-012

		CUAGUCAGGUACGC	
194	D-RNA (AP-TÂMERO)	GCGCGGUGUGAUCUAG AUGUAUUGGCUGAUC- CUAGUCAGGCGCGC	193-G2-013
195	D-RNA (AP-TÂMERO)	GCGCGUGUGAUCUA- GAUGUAUUGGCU- GAUCCUAGU- CAGGGCGC	193-G2-014
196	D-RNA (AP-TÂMERO)	GGGCGUGUGAUCUA- GAUGUAUUGGCU- GAUCCUAGU- CAGGGCCC	193-G2-015
197	D-RNA (AP-TÂMERO)	GGCCGUGUGAUCUA- GAUGUAUUGGCU- GAUCCUAGU- CAGGGGCC	193-G2-016
198	D-RNA (AP-TÂMERO)	GCCCGUGUGAUCUA- GAUGUAUUGGCU- GAUCCUAGU- CAGGGGGC	193-G2-017
199	D-RNA (AP-TÂMERO)	GUGCUGCGGGGGUU- AGGGCUAGAA- GUCGGCCUGCAGCAC	197-B2
200	D-RNA (AP-TÂMERO)	AGCGUGGCGAGGUU- AGGGCUAGAAGUCG- GUCGACACGCU	191-D5-001
201	D-RNA (AP-TÂMERO)	GUGUUGCGGAGGUU- AGGGCUAGAAGUCG- GUCAGCAGCAC	197-H1
202	D-RNA (AP-TÂMERO)	CGUGCGCUUGAGAUAG GGGUUAGGGCUUAAA- GUCGGCUGAUUCU-	190-A3-001

		CACG	
203	D-RNA (AP-TÂMERO)	AGCGUGAAGGGGUU- AGGGCUCGAAGUCGG- CUGACACGCU	191-A5
204	D-RNA (AP-TÂMERO)	GUGCUGCGGGGGUU- AGGGCUCGAA- GUCGGCCCGCAGCAC	197-H3
205	D-RNA (AP-TÂMERO)	GUGUUCCCGGGGUU- AGGGCUUGAA- GUCGGCCCGCAGCAC	197-B1

TABELA 1 (N)

Seq.-ID	RNA/Peptídeo	Seqüência	Referência Interna
206	D-RNA (AP-TÂMERO)	GUGUUGCAGGGGUU- AGGGCUUGAA- GUCGGCCUGCAGCAC	197-E3
207	D-RNA (AP-TÂMERO)	GUGCUGCGGGGGUU- AGGGCUCAA- GUCGGCCUGCAGCAC	197-H2
208	D-RNA (AP-TÂMERO)	GUGCUGCCGGGGUU- AGGGCUAA- AGUCGGCCGACAGCAC	197-D1
209	D-RNA (AP-TÂMERO)	GUGCUGUGGGGGU- CAGGGCUAGAA- GUCGGCCUGCAGCAC	197-D2
210	D-RNA (AP-TÂMERO)	UGAGAUAGGGGUU- AGGGCUUAAAGUCGG- CUGAUUCUCA	190-A3-003
211	D-RNA (AP-TÂMERO)	GAGAUAGGGGUU- AGGGCUUAAAGUCGG- CUGAUUCUC	190-A3-004
212	D-RNA (AP-TÂMERO)	GGGGUUAGGGCUUAA- AGUCGGCUGAUUCU	190-A3-007

213	D-RNA (AP-TÂMERO)	GCGUGGCGAGGUU- AGGGCUAGAAGUCG- GUCGACACGC	191-D5-002
214	D-RNA (AP-TÂMERO)	CGUGGCGAGGUU- AGGGCUAGAAGUCG- GUCGACACG	191-D5-003
215	D-RNA (AP-TÂMERO)	CGGGCGAGGUU- AGGGCUAGAAGUCG- GUCGACCG	191-D5-004
216	D-RNA (AP-TÂMERO)	CGGGCGAGGUU- AGGGCUAGAAGUCG- GUCGCCCCG	191-D5-005
217	D-RNA (AP-TÂMERO)	CGGCGAGGUUAGGG- CUAGAAGUCG- GUCGCCG	191-D5-006
218	D-RNA (AP-TÂMERO)	CGGGAGGUUAGGGCU- AGAAGUCGGUCCCG	191-D5-007
219	D-RNA (AP-TÂMERO)	GGGAGGUUAGGGCU- AGAAGUCGGUCCC	191-D5-010
220	D-RNA (AP-TÂMERO)	CCGCGGUUAGGGCUA- GAAGUCGGGCGG	191-D5-017
221	D-RNA (AP-TÂMERO)	CCCGGGUUAGGGCUA- GAAGUCGGGCGG	191-D5-029
222	D-RNA (AP-TÂMERO)	GGCGGGUUAGGGCU- AGAAGUCGGCGCC	191-D5-024
223	D-RNA (AP-TÂMERO)	CCCGCGGUUAGGGCU- AGAAGUCGGGCGGG	191-D5-017-29a

TABELA 1 (O)

Seq.-ID	RNA/Peptídeo	Seqüência	Referência Interna
224	D-RNA (AP-TÂMERO)	GCCGCGGUUAGGGCU- AGAAGUCGGGCGGC	191-D5-017-29b
225	D-RNA (AP-	CCCCGGGUUAGGGCU-	191-D5-019-29a

	TÂMERO)	AGAAGUCGGCGGGG	
226	D-RNA (AP-TÂMERO)	CGGCGGGUUAGGG-CUAGAAGUCGGCGCCG	191-D5-024-29a
227	D-RNA (AP-TÂMERO)	GGGCGGGUUAGGG-CUAGAAGUCGGCGCCC	191-D5-024-29b
228	D-RNA (AP-TÂMERO)	UGCUGCGGGGGUU-AGGGCUAGAA-GUCGGCCUGCAGCA	197-B2-001
229	D-RNA (AP-TÂMERO)	GCUGCGGGGGUU-AGGGCUAGAA-GUCGGCCUGCAGC	197-B2-002
230	D-RNA (AP-TÂMERO)	CUGCGGGGGUU-AGGGCUAGAA-GUCGGCCUGCAG	197-B2-003
231	D-RNA (AP-TÂMERO)	UGC GGGGGUUAGGG-CUAGAAGUCGGCCUG-CA	197-B2-004
232	D-RNA (AP-TÂMERO)	GCGGGGGUUAGGG-CUAGAAGUCGGCCUGC	197-B2-005
233	D-RNA (AP-TÂMERO)	GCCGGGGUUAGGG-CUAGAAGUCGGCCGGC	197-B2-006
234	D-RNA (AP-TÂMERO)	GGCCGGGGUUAGGG-CUAGAA-GUCGGCCGGCC	197-B2-006-31a
235	D-RNA (AP-TÂMERO)	CGCCGGGGUUAGGG-CUAGAA-GUCGGCCGGCG	197-B2-006-31b
236	D-RNA (AP-TÂMERO)	CGUGGUCCGUUGUGU CAGGUCU-AUUCGCCCCGGUG-CAGGGCAUCCGCG	194-A2-001
236	D-RNA (AP-	GCAGUGUGACGCGGAC	196-B12-003

	TÂMERO)	GUGAUAGGACAGAG- CUGAUCCCGCUCAG- GUGAG	
238	D-RNA (AP- TÂMERO)	CAACAGCAGUGUGACG CGGACGUGAUAGGA- CAGAGCUGAUCCCG- CUCAG	196-B12-004

TABELA 1 (P)

Seq.-ID	RNA/Peptídeo	Seqüência	Referência Interna
239	L-RNA (Spie- gelmero)	5'-PEG- UAAGGAAACUCGGU- CUGAUGCUGUAGCG- CUGUGCAGAGCU	Spiegelmero Con- trole PEGuilado
240	L-RNA (Spie- gelmero)	GATCACACCACGC- (C18-PEG-espaçador)- (C18-PEG-espaçador)-1- NH ₂ -3'	sonda de captura 193-G2-012-5'- PEG
241	L-RNA (Spie- gelmero)	5'-NH ₂ -(C18-PEG- espaçador)-(C18-PEG- espaçador)- GCGUACCUGAC	sonda de detecção de 193-G2-012-5'- PEG

A presente invenção é adicionalmente ilustrada pelas figuras, exemplos e a listagem de seqüência dos quais características adicionais, modalidades e vantagens podem ser tiradas, em que

5 A Fig. 1 mostra um alinhamento de seqüências de ligantes de RNA relacionados ligando a SDF-1 humano indicando o motivo de seqüência ("Tipo A") que é em uma modalidade preferencial em sua totalidade essencial para ligar a SDF-1 humano;

10 A Fig. 2A mostra derivados de ligante de RNA 192-A10-001 (ligante de RNA de SDF-1 humano de motivo de seqüência "Tipo A");

A Fig. 2B mostra derivados de ligante de RNA 192-A10-001 (ligante de RNA de SDF-1 humano de motivo de seqüência "Tipo A");

A Fig. 3 mostra um alinhamento de seqüências de ligantes de RNA relacionados ligando a SDF-1 humano indicando o motivo de seqüência (“Tipo B”) que é em uma modalidade preferencial em sua totalidade essencial para ligar a SDF-1 humano;

5 A Fig. 4A mostra derivados de ligantes de RNA 193-C2-001 e 193-G2-001 (ligantes de RNA de SDF-1 humano de motivo de seqüência “Tipo B”);

 A Fig. 4B mostra derivados de ligantes de RNA 193-C2-001 e 193-G2-001 (ligantes de RNA de SDF-1 humano de motivo de seqüência “Tipo B”);

10

A Fig. 5 mostra um alinhamento de seqüências de ligantes de RNA relacionados ligando a SDF-1 humano indicando o motivo de seqüência (“Tipo C”) que é em uma modalidade preferencial em sua totalidade essencial para ligar a SDF-1 humano;

15 A Fig. 6 mostra derivados de ligante de RNA 190-A3-001 (ligante de RNA de SDF-1 humano de motivo de seqüência “Tipo C”);

A Fig. 7A mostra derivados de ligante de RNA 190-D5-001 (ligante de RNA de SDF-1 humano de motivo de seqüência “Tipo C”);

A Fig. 7B mostra derivados de ligante de RNA 190-D5-001 (ligante de RNA de SDF-1 humano de motivo de seqüência “Tipo C”);

20

A Fig. 8 mostra derivados de ligante de RNA 197-B2 (ligante de RNA de SDF-1 humano de motivo de seqüência “Tipo C”);

A Fig. 9 mostra ligantes de RNA adicionais ligando a SDF-1 humano;

25 A Fig. 10 mostra a quimiotaxia induzida por SDF-1 humano de células de leucemia de células T humanas Jurkat visto que depois de 3 horas de migração de células de leucemia de células T humanas Jurkat em direção a várias concentrações de SDF-1 humano foi obtida uma curva de dose-resposta para SDF-1 humano, representada como sinal de fluorescência sobre concentração de SDF-1 humano;

30

A Fig. 11 mostra o resultado de uma análise de ligação do aptâmero 192-A10-001 de ligação de SDF-1 humano a p-SDF-1 humano bioti-

nilado 37°C, representado como ligação do aptâmero sobre concentração de D-SDF-1 humano biotinilado;

5 A Fig. 12 mostra a eficácia de Spiegelmero 192-A10-001 de ligação de SDF-1 humano em uma prova de quimiotaxia; as células foram deixadas para migrar em direção a 0,3 nM de SDF-1 humano pré-incubado a 37°C com várias quantidades de Spiegelmero 192-A10-001, representadas como percentagem de controle sobre concentração de Spiegelmero 192-A10-001;

10 A Fig. 13 mostra o resultado de uma análise de ligação competitiva dos aptâmeros de ligação de SDF-1 humano 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 humano biotinilado a 37°C, representada como ligação do aptâmero marcado 192-A10-001 (usado como referência que é deslocado pelos aptâmeros não marcados) a 1 nM e 5 nM de aptâmeros não marcados 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;

20 A Fig. 14 mostra o resultado de uma análise de ligação do aptâmero 192-A10-008 de ligação de SDF-1 humano a D-SDF-1 humano biotinilado a 37°C, representada como ligação do aptâmero sobre concentração de D-SDF-1 humano biotinilado;

25 A Fig. 15 mostra um sensorgrama Biacore 2000 indicando o valor K_D do Spiegelmero 192-A10-008 de ligação de SDF-1 humano ligando a SDF-1 humano o qual foi imobilizado sobre um chip sensor PioneerF1 por procedimento de ligação de amina, representado como resposta (RU) sobre tempo, adicionalmente são listados as taxas ligado (on) e desligado (off) e os valores K_D dos Spiegelmeros 192-A10-008 e 192-A10-001;

30 A Fig. 16 mostra a eficácia de Spiegelmero 192-A10-008 de ligação de SDF-1 em uma prova de quimiotaxia; as células foram deixadas para migrar em direção a 0,3 nM de SDF-1 humano pré-incubado a 37°C com várias quantidades de Spiegelmero 192-A10-008, representadas como percentagem de controle sobre concentração do Spiegelmero 192-A10-008;

A Fig. 17 mostra um sensorgrama Biacore 2000 indicando o valor K_D de Spiegelmero 193-G2-01 ligando a SDF-1 humano o qual foi imobilizado sobre um chip sensor PioneerF1 por procedimento de ligação de amina, representado como resposta (RU) sobre tempo, adicionalmente as

5 taxas ligado (on) e desligado (off) e os valores K_D dos Spiegelmeros 193-G2-001 e 193-C2-001 são listados;

A Fig. 18 mostra o resultado de uma análise de ligação do aptâmero 193-G2-012 anti-SDF-1 humano a D-SDF-1 humano biotinilado a 37°C, representada como ligação do aptâmero sobre concentração de D-

10 SDF-1 humano biotinilado;

A Fig. 19 mostra o resultado de uma análise de ligação competitiva dos aptâmeros de ligação de SDF-1 humano 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 a D-SDF-1 humano biotinilado a

15 37°C, representada como ligação do aptâmero marcado 190-A3-001 ou 191-D5-001 (usado como referência que é deslocado pelos aptâmeros não marcados) a 500 nM, 50 nM e 10 nM de aptâmeros não marcados 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;

A Fig. 20 mostra o resultado de uma análise de ligação dos aptâmeros de ligação de SDF-1 humano 190-A3-004 e 191-D5-007 a D-SDF-1 humano biotinilado a 37°C, representada como ligação do aptâmero sobre

20 concentração de D-SDF-1 humano biotinilado;

A Fig. 21 mostra um sensorgrama Biacore 2000 indicando o valor K_D de Spiegelmero 191-D5-007 ligando a SDF-1 humano o qual foi imobilizado sobre um chip sensor PioneerF1 por procedimento de ligação de amina, representada como resposta (RU) sobre tempo, adicionalmente as

25 taxas ligado (on) e desligado (off) e os valores K_D dos Spiegelmeros 191-D5-001, 191-D5-007, 190-A3-003 e 197-B2 são listados;

A Fig. 22 mostra a eficácia de Spiegelmero 190-A3-004 de ligação de SDF-1 em uma prova de quimiotaxia; as células foram deixadas para migrar em direção a 0,3 nM de SDF-1 humano pré-incubado a 37°C com

30

várias quantidades de Spiegelmero 190-A3-004, representadas como percentagem de controle sobre concentração de Spiegelmero 190-A3-004;

A Fig. 23A mostra a eficácia de Spiegelmeros de ligação de SDF-1 193-G2-012-5'-PEG, 197-B2-006-5'-PEG, 191-D5-007-5'-PEG e 191-A10-008-5'-PEG em uma prova de quimiotaxia; as células foram deixadas para migrar em direção a 0,3 nM de SDF-1 humano pré-incubado a 37°C com várias quantidades de Spiegelmeros 193-G2-012-5'-PEG, 197-B2-006-5'-PEG, 191-D5-007-5'-PEG e 191-A10-008-5'-PEG, representadas como percentagem de controle sobre concentração de Spiegelmeros 193-G2-012-5'-PEG, 197-B2-006-5'-PEG, 191-D5-007-5'-PEG e 191-A10-008-5'-PEG;

A Fig. 23B mostra a eficácia de Spiegelmeros de ligação de SDF-1 197-B2-006-5'-PEG e 197-B2-006-31b-5'-PEG em uma prova de quimiotaxia; as células foram deixadas para migrar em direção a 0,3 nM de SDF-1 humano pré-incubado a 37°C com várias quantidades de Spiegelmeros 197-B2-006-5'-PEG e 197-B2-006-31b-5'-PEG, representadas como percentagem de controle sobre concentração de Spiegelmeros 197-B2-006-5'-PEG e 197-B2-006-31b-5'-PEG;

A Fig. 24A mostra um sensorgrama Biacore 2000 indicando os valores de K_D de Spiegelmeros 193-G2-012-5'-PEG, 191-A10-008-5'-PEG e 191-A10-001-5'-PEG ligando a SDF-1 humano o qual foi imobilizado sobre um chip sensor PioneerF1 por procedimento de ligação de amina, representado como resposta (RU) sobre tempo;

A Fig. 24B mostra um sensorgrama Biacore 2000 indicando os valores de K_D de Spiegelmeros 197-B2-006-5'-PEG, 197-B2-006-31b-5'-PEG e 191-D5-007-5'-PEG ligando a SDF-1 humano o qual foi imobilizado sobre um chip sensor PioneerF1 por procedimento de ligação de amina, representado como resposta (RU) sobre tempo;

A Fig. 25A mostra a eficácia de Spiegelmeros de ligação de SDF-1 192-A10-001, 192-A10-001-5'-HES130 e 192-A10-001-5'-HES100 em uma prova de quimiotaxia; as células foram deixadas para migrar em direção a 0,3 nM de SDF-1 humano pré-incubado a 37°C com várias quantidades de Spiegelmeros 192-A10-001, 192-A10-001-5'-HES130 e 192-A10-001-5'-

HES100, representadas como percentagem de controle sobre concentração de Spiegelmeros 192-A10-001, 192-A10-001-5'-HES130 e 192-A10-001-5'-HES100;

5 A Fig. 25B mostra a eficácia de Spiegelmeros de ligação de SDF-1 192-A10-001, 192-A10-001-5'-PEG30 e 192-A10-001-5'-PEG40 em uma prova de quimiotaxia; as células foram deixadas para migrar em direção a 0,3 nM de SDF-1 humano pré-incubado a 37°C com várias quantidades de Spiegelmeros 192-A10-001, 192-A10-001-5'-PEG30 e 192-A10-001-5'-PEG40, representadas como percentagem de controle sobre concentração
10 de Spiegelmeros 192-A10-001, 192-A10-001-5'-PEG30 e 192-A10-001-5'-PEG40;

A Fig. 26 mostra a ineficácia de um Spiegelmero controle em uma prova de quimiotaxia; as células foram deixadas para migrar em direção a 0,3 nM de SDF-1 humano ou murino pré-incubado a 37°C com várias
15 quantidades de Spiegelmero controle, representadas como percentagem de controle sobre concentração de Spiegelmero controle;

A Fig. 27 mostra a quimiotaxia induzida por SDF-1 murino de células de leucemia de células T humanas Jurkat visto que depois de 3 horas de migração de células de leucemia de células T humanas Jurkat em
20 direção a várias concentrações de SDF-1 foi obtida uma curva de dose-resposta para SDF-1, representada como sinal de fluorescência;

A Fig. 28 mostra a eficácia de Spiegelmeros de ligação de SDF-1 192-A10-001 e 191-D5-007-5'PEG em uma prova de quimiotaxia; as células foram deixadas para migrar em direção a 0,3 nM de SDF-1 murino pré-
25 incubado a 37°C com várias quantidades de Spiegelmeros 192-A10-001 e 191-D5-007-5'PEG representadas como percentagem de controle sobre concentração de Spiegelmeros 192-A10-001 e 191-D5-007-5'PEG;

A Fig. 29 mostra a eficácia de Spiegelmero 192-A10-001 de ligação de SDF-1 em uma prova de ligação de CXCR4-receptor usando [¹²⁵J]-
30 SDF-1 humano que foi pré-incubado a 37°C com várias quantidades de Spiegelmeros 192-A10-001, [¹²⁵J]-SDF-1 especificamente ligado foi plotado sobre concentração de Spiegelmero 192-A10-001; e

A Fig. 30 mostra a inibição da estimulação de MAP-quinase de células expressando CXCR4 com 1 nM de SDF-1 humano por Spiegelmero 192-A10-001 de ligação de SDF-1 humano;

A Fig. 31 mostra a inibição de germinação induzida por SDF-1 por Spiegelmero 193-G2-012-5'-PEG de ligação de SDF-1 humano e por Spiegelmero Controle PEGuilado em prova de germinação do anel aórtico, por meio da qual anéis de aorta de rato foram embutidos em matriz de colágeno e incubados por 6 dias com SDF-1 com ou sem Spiegelmeros (a: controle; b: 10 nM de SDF-1; c: 10 nM de SDF-1 + 1 μ M de Spiegelmero 193-G2-012-5'-PEG de ligação de SDF-1 humano; d: 10 nM de SDF-1 + 1 μ M de Spiegelmero Controle PEGuilado);

A Fig. 32 mostra a inibição de germinação induzida por SDF-1 por Spiegelmero 193-G2-012-5'-PEG de ligação de SDF-1 humano e por Spiegelmero Controle PEGuilado em prova de germinação do anel aórtico por meio da qual os índices de germinação são mostrados como média $\pm$ desvio padrão para 5 anéis por condição (*: o valor para SDF-1 é significativamente diferente do controle (teste de Mann-Whitney; $p = 0,009$); **: o valor para SDF-1 + Spiegelmero de ligação de SDF-1 humano 193-G2-012-5'-PEG é significativamente diferente do valor para SDF-1 (teste de Mann-Whitney; $p = 0,028$);

A Fig. 33 mostra o nível plasmático de Spiegelmero 193-G2-012-5'-PEG de ligação de SDF-1 humano e de SDF-1 em ratos depois um bolo intravenoso de Spiegelmero 193-G2-012-5'-PEG de ligação de SDF-1 humano em comparação com o nível plasmático de SDF-1 de rato que não foi tratado com Spiegelmero 193-G2-012-5'-PEG de ligação de SDF-1 humano, por meio do qual o nível plasmático de Spiegelmero 193-G2-012-5'-PEG de ligação de SDF-1 humano e de SDF-1 foram determinados durante um período de 96 horas;

Exemplo 1: Ácidos nucleicos que ligam SDF-1 humano

Usando D-SDF-1 humano biotinilado como um alvo, vários ácidos nucleicos que ligam a SDF-1 humano podem ser gerados cujas seqüências de nucleotídeos são representadas nas Figuras 1 a 9. Os ácidos nucléi-

cos foram caracterizados no nível de aptâmero, isto é, nível de ácido nucléico-D com D-SDF-1 humano biotinilado ou no nível de Spiegelmero, isto é, ácido nucléico-L com a configuração natural de SDF-1 (L- SDF-1).

5 Aptâmeros foram analisados com D- SDF-1 humano biotinilado usando provas de ligação de *pull down* competitiva ou direta com D-SDF-1 humano biotinilado (Exemplo 4). Spiegelmeros foram testados com a configuração natural de SDF-1 (L-SDF-1) por medição da ressonância de plasmon superficial usando um instrumento Biacore 2000 (Exemplo 6) e uma prova de quimiotaxia *in vitro* de cultura celular (Exemplo 5).

10 As moléculas de ácido nucléico produzidas deste modo apresentam diferentes motivos de seqüência, três tipos principais são definidos nas Figs. 1, 2A e 2B (Tipo A), Figs. 3, 4A e 4B (Tipo B), Figs. 5, 6, 7A, 7B e 8 (Tipo C). Para definição de motivos de seqüência de nucleotídeos, são usadas as abreviações IUPAC para nucleotídeos ambíguos:

15	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;
20	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;
25	N	todas	A ou G ou C ou U

Caso não indicado ao contrário, qualquer seqüência de ácido nucléico ou seqüência de trechos e caixas, respectivamente, é indicada na direção 5' → 3'.

1.1 Ácidos nucléicos de ligação de SDF-1 do Tipo A

30 Conforme representado na Fig. 1 todas as seqüências de ácidos nucléicos de ligação de SDF-1 do Tipo A compreendem uma seqüência de nucleotídeos de núcleo a qual é flanqueada por trechos de 5'- e 3'-terminal

que podem hibridizar uns com os outros. No entanto, semelhante hibridização não é necessariamente dada na molécula.

Os ácidos nucléicos foram caracterizados no nível de aptâmero usando provas de ligação de *pull down* direta e competitiva com D-SDF-1 humano biotinilado de modo a classificar os mesmos com respeito a seu comportamento de ligação (Exemplo 4). Sequências selecionadas foram sintetizadas como Spiegelmeros (Exemplo 3) e foram testadas usando a configuração natural de SDF-1 (L-SDF) em uma prova de quimiotaxia *in vitro* de cultura celular (Exemplo 5) e por medição da ressonância de plasmon superficial usando um instrumento Biacore 2000 (Exemplo 6).

As seqüências das caixas definidas ou trechos pode ser diferente entre os ácidos nucléicos de ligação de SDF-1 do Tipo A o que influencia a afinidade de ligação a SDF-1. Com base na análise de ligação dos diferentes ácidos nucléicos de ligação de SDF-1 resumidos como ácidos nucléicos de ligação de SDF-1 do Tipo A, a seqüência de nucleotídeos de núcleo e suas seqüências de nucleotídeos conforme descrito a seguir são individualmente e mais preferencialmente em sua totalidade essenciais para ligar a SDF-1:

A seqüência de nucleotídeos de núcleo de todas as seqüências identificadas de ácidos nucléicos de ligação de SDF-1 do Tipo A compartilham a seqüência AAAGYRACAHGUMAAX_AUGAAAGGUARC (Fórmula-1 de Tipo A), por meio da qual X_A ou está ausente ou é 'A'. Se 'A' está ausente, a seqüência da seqüência de nucleotídeos de núcleo pode ser resumida como Fórmula-2 de Tipo A (AAAGYRACAHGUMAAUGAAAGGUARC). Ácido nucléico de ligação de SDF-1 do Tipo A 191-A6 (seqüência de nucleotídeos de núcleo: AAAGUACACGUAAAUGAAAGGUAAC) carregando o nucleotídeo adicional 'A' dentro da seqüência de nucleotídeos de núcleo e ainda ligando a SDF-1 deixa inferir uma seqüência de nucleotídeos de núcleo alternativa (AAAGYRACAHGUMAAAUGAAAGGUARC, Fórmula-3 de Tipo A). Exemplarmente para todos os outros ácidos nucléicos de ácidos nucléicos de ligação de SDF-1 do Tipo A, o ácido nucléico 192-A10-001 de ligação de SDF-1 do Tipo A foi caracterizado por sua afinidade de ligação a

SDF-1 humano. A constante de ligação de equilíbrio K_D foi determinada usando a prova de ligação de *pull down* ($K_D = 1,5$ nM, Fig. 11) e por medição da ressonância de plasmon superficial ($K_D = 1,0$ nM, Fig. 15). A IC_{50} (concentração inibitória de 50%) de 0,12 nM para 192-A10-001 foi medida usando uma prova de quimiotaxia *in vitro* de cultura celular (Fig. 12). Conseqüentemente, todos os ácidos nucleicos de ligação de SDF-1 do Tipo A conforme representado na Fig. 1 foram analisados em uma prova de ligação de *pull down* competitiva vs. 192-A10-001 (Fig. 13; nem todos os ácidos nucleicos de ligação de SDF-1 do Tipo A testados são mostrados na Fig. 13). Os ácidos nucleicos 192-B11 e 192-C10 de ligação de SDF-1 do Tipo A apresentaram afinidades de ligação iguais a 192-A10-001 nestes experimentos de competição. Afinidade de ligação mais fraca foi determinada para ácidos nucleicos 192-G10, 192-F10, 192-C9, 192-E10, 192-D11, 192-G11, 192-H11 e 191-A6 de ligação de SDF-1 do Tipo A. Os ácidos nucleicos 192-D10, 192-E9 e 192-H9 de ligação de SDF-1 do Tipo A têm afinidade de ligação muito mais fraca do que 192-A10-001 (Fig. 13).

Conforme mencionado acima, o ácido nucleico 192-B11 e 192-C10 de ligação de SDF-1 do Tipo A apresenta igual afinidade de ligação a SDF-1 que 192-A10-001. No entanto, apresentam ligeiras diferenças na sequência de nucleotídeos da sequência de nucleotídeos de núcleo. Portanto a sequência de consenso das três moléculas ligando a SDF-1 com quase a mesma alta afinidade de pode resumida pela sequência de nucleotídeos AAAGYAACAHGUCAAUGAAAGGUARC (Fórmula-4 de Tipo A) por meio da qual a sequência de nucleotídeos da sequência de nucleotídeos de núcleo de 192-A10-001 (sequência de nucleotídeos: AAAGCAACAUGUCAAUGA-AAGGUAGC) representa a sequência de nucleotídeos com a melhor afinidade de ligação de ácidos nucleicos de ligação de SDF-1 do Tipo A.

Cinco ou seis dos seis nucleotídeos do trecho de 5'-terminal de ácidos nucleicos de ligação de SDF-1 do Tipo A podem hibridizar aos cinco ou seis nucleotídeos respectivos dos seis nucleotídeos dos ácidos nucleicos de ligação de SDF-1 do Tipo A do trecho de 3'-terminal para formar uma hélice de terminal. Embora estes nucleotídeos sejam variáveis em várias posi-

ções, os diferentes nucleotídeos permitem hibridização de cinco ou seis dos seis nucleotídeos dos trechos de 5'- e 3'-terminal cada. Os trechos de 5'-terminal e 3'-terminal de ácidos nucleicos de ligação de SDF-1 do Tipo A conforme mostrado na Fig. 1 podem ser resumidos em uma fórmula genérica para o trecho de 5'-terminal ('RSHRYR', Fórmula-5-5' de Tipo A) e para o
 5 trecho de 3'-terminal ('YRYDSY', Fórmula-5-3' de Tipo A). Derivados truncados de ácido nucleico de ligação de SDF-1 do Tipo A 192-A10-001 foram analisados em uma prova de ligação de *pull down* competitiva vs. A molécula original 192-A10-001 e 192-A10-008 (Fig. 2A e 2B). Estes experimentos
 10 mostraram que uma redução dos seis nucleotídeos de terminal (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 da afinidade de ligação. No entanto, a
 15 truncação para quatro nucleotídeos terminais (extremidade 5': **UGUG**; extremidade 3': **CGCA**; 192-A10-003) ou menos (192-A10-004/ -005/ -006/ -007) levou a afinidade de ligação reduzida para SDF-1 (Fig. 2A). Os trechos de 5'-terminal e 3'-terminal determinados com uma extensão de cinco e quatro nucleotídeos dos derivados de ácido nucleico de ligação de SDF-1 do Tipo A 192-A10-001 conforme mostrado na Figs. 2A e B podem ser descritos
 20 em uma fórmula genérica para o trecho de 5'-terminal ('X₂BBBS', Fórmula-6-5' de Tipo A) e do trecho de 3'-terminal ('SBBVX₃'; Fórmula-6-3' de Tipo A), por meio da qual X₂ ou está ausente ou é 'S' e X₃ ou está ausente ou é 'S'.

A seqüência de nucleotídeos dos trechos de 5'- e 3'-terminal tem uma influência sobre a afinidade de ligação de ácidos nucleicos de ligação de SDF-1 do Tipo A. Isto é não somente mostrado pelos ácidos nucleicos 192-F10 e 192-E10, mas também por derivados de 192-A10-001 (Fig. 2B;).
 25 As seqüências de nucleotídeos de núcleo 192-F10 e 192-E10 são idênticas a 192-B11 e 192-C10, mas compreendem ligeiras diferenças na extremidade 3' do trecho de 5'-terminal e na extremidade 5' do trecho de 3'-terminal resultando em afinidade de ligação reduzida.
 30

A substituição de nucleotídeos de 5'- e 3'-terminal '**CUGUG**' e '**CGCAG**' de ácido nucleico de ligação de SDF-1 do Tipo A 192-A10-002 por

‘GCGCG’ e ‘CGCGC’ (192-A10-015) resultou em uma reduzida afinidade de ligação ao passo que substituições por ‘GCGUG’ e ‘CGCGC’ (192-A10-008) resultou na mesma afinidade de ligação conforme mostrado para 192-A10-002 (Fig. 2B, Fig. 15, Fig. 12, Fig. 16). Adicionalmente, nove derivados de ácido nucléico de ligação de SDF-1 do Tipo A 192-A10-001 (192-A10-014/ -015/ -016/ -017/ -018/ -019/ -020/ -021/ -022/ -023) portando quatro nucleotídeos de 5'- e 3'-terminal respectivamente foram testados como aptâmeros para sua afinidade de ligação vs. 192-A10-001 ou seu derivado 192-A10-008 (ambos têm a afinidade de ligação idêntica para SDF-1). Todos os clones apresentaram afinidade de ligação mais fraca, muito mais fraca ou muiíssi-
mo mais fraca para SDF-1 que 192-A10-001 (seis nucleotídeos formando uma hélice terminal) ou como 192-A10-008 com cinco nucleotídeos terminais, respectivamente (Fig. 2B). Conseqüentemente, a seqüência e o número de nucleotídeos dos trechos de 5'- e 3'-terminal são essenciais para uma
ligação eficaz a SDF-1. Conforme mostrado para ácidos nucléicos de ligação de SDF-1 do Tipo A 192-A10-002 e 192-A10-08 a combinação preferencial de trechos de 5'- e 3'-terminal são ‘CUGUG’ e ‘CGCAG’ (trechos de 5'- e 3'-terminal de ácido nucléico de ligação de SDF-1 do Tipo A 192-A10-002) e ‘GCGUG’ e ‘CGCGC’ (trechos de 5'- e 3'-terminal de ácido nucléico de ligação de SDF-1 do Tipo A 192-A10-008).

No entanto, combinando os trechos de 5'- e 3'-terminal de todos os ácidos nucléicos de ligação de SDF-1 do Tipo A testados a fórmula genérica para o trecho de 5'-terminal de ácidos nucléicos de ligação de SDF-1 do Tipo A é ‘X₁X₂NNBV’ (Fórmula-7-5’ do Tipo A) e a fórmula genérica para o trecho de 3'-terminal de ácidos nucléicos de ligação de SDF-1 do Tipo A é ‘BNBNX₃X₄’ (Fórmula-7-3’ do Tipo A), ao passo que

X₁ é ‘R’ ou está ausente, X₂ é ‘S’, X₃ é ‘S’ e X₄ é ‘Y’ ou está ausente;

ou

X₁ está ausente, X₂ é ‘S’ ou está ausente, X₃ é ‘S’ ou está ausente e X₄ está ausente.

1.2 Ácidos nucléicos de ligação de SDF-1 do Tipo B

Conforme representado na Fig. 3 todas as seqüências de ácidos nucleicos de ligação de SDF-1 do Tipo B compreendem uma seqüência de nucleotídeos de núcleo a qual é flanqueada por trechos de 5'- e 3'-terminal que podem hibridizar uns aos outros. No entanto, semelhante hibridização não é necessariamente dada na molécula.

Os ácidos nucleicos foram caracterizados no nível de aptâmeros usando provas de ligação de *pull down* direta e competitiva com D-SDF-1 humano biotilado de modo a classificar os mesmos com respeito a seu comportamento de ligação (Exemplo 4). Seqüências selecionadas foram sintetizadas como Spiegelmeros (Exemplo 3) e foram testadas usando a configuração natural de SDF-1 (L-SDF) em uma prova de quimiotaxia *in vitro* de cultura celular (Exemplo 5) e por medição da ressonância de plasmon superficial usando um instrumento Biacore 2000 (Exemplo 6).

As seqüências das caixas ou trechos definidos podem ser diferentes entre os ácidos nucleicos de ligação de SDF-1 do Tipo B o que influencia a afinidade de ligação para SDF-1. Com base na análise de ligação dos diferentes ácidos nucleicos de ligação de SDF-1 resumidos como ácidos nucleicos de ligação de SDF-1 do Tipo B, a seqüência de nucleotídeos de núcleo e suas seqüências de nucleotídeos conforme descrito a seguir são individualmente e mais preferencialmente em sua totalidade essenciais para ligar a SDF-1:

A seqüência de nucleotídeos de núcleo de todas as seqüências de ácidos nucleicos de ligação de SDF-1 do Tipo B identificadas compartilham a seqüência GUGUGAUCUAGAUGUADWGGCUGWUCCUAGUYAGG

(Fórmula-1 do Tipo B). Os ácidos nucleicos de ligação de SDF-1 do Tipo B 193-G2-001, 193-C2-001 e 193-F2-001 que diferem em uma posição da seqüência de nucleotídeos de núcleo foram analisados em uma prova de ligação de *pull down* competitiva vs. O ácido nucleico de ligação de SDF-1 do Tipo A 192-A10-001 (K_D de 1,5 nM determinada em uma prova de ligação de *pull down* [Fig. 11], K_D de 1,0 nM determinada por medição da ressonância de plasmon superficial [Fig. 15], IC_{50} de 0,12 nM; [Fig. 12]). Cada um dos três ácidos nucleicos de ligação de SDF-1 do Tipo B testados apresentou

ligação superior a SDF-1 humano em comparação a ácido nucléico de ligação de SDF-1 do Tipo A 192-A10-001 por meio da qual a afinidade de ligação de 193-G2-001 é tão boa quanto 193-C2-001 e 193-F2-001 (Fig. 3). Os dados sugerem que a diferença na sequência de nucleotídeos da sequência de nucleotídeos de núcleo de ácidos nucléicos de ligação de SDF-1 do Tipo B 193-G2-001, 193-C2-001 e 193-F2-001 não tem influência sobre a afinidade de ligação a SDF-1. Exemplarmente o ácido nucléico de ligação de SDF-1 do Tipo B 193-G2-001 foi caracterizado por sua afinidade de ligação a SDF-1 humano. A constante de ligação de equilíbrio K_D foi determinada usando a prova de ligação de *pull down* ($K_D = 0,3$ nM) e por medição da ressonância de plasmon superficial ($K_D = 0,5$ nM, Fig. 17). A IC_{50} (concentração inibitória de 50%) de 0,08 nM para 193-G2-001 foi medida usando uma prova de quimiotaxia *in vitro* de cultura celular. Em contraste, os ácidos nucléicos de ligação de SDF-1 do Tipo B 193-B3-002, 193-H3-002, 193-E3-002 e 193-D1-002 que diferem na sequência da sequência de nucleotídeos de núcleo têm piores propriedades de ligação (Fig. 3). Em consequência ácidos nucléicos de ligação de SDF-1 do Tipo B com aprimorada afinidade de ligação a SDF-1 compartilham uma sequência de nucleotídeos de núcleo com a sequência GUGUGAUCUAGAUGUADUGGCUGAUCCUAGUCAGG (Fórmula-2 do Tipo B).

Quatro, cinco ou seis nucleotídeos dos seis nucleotídeos do trecho de 5'-terminal de ácidos nucléicos de ligação de SDF-1 do Tipo B podem hibridizar aos respectivos quatro, cinco ou seis dos seis nucleotídeos do trecho de 3'-terminal de ácidos nucléicos de ligação de SDF-1 do Tipo B para formar uma hélice terminal. Embora os nucleotídeos sejam variáveis em várias posições, os diferentes nucleotídeos permitem a hibridização para quatro, cinco ou seis nucleotídeos dos seis nucleotídeos dos trechos de 5'- e 3'-terminal cada. Os trechos de 5'-terminal e de 3'-terminal de ácidos nucléicos de ligação de SDF-1 do Tipo B conforme mostrado na Fig. 3 podem ser resumidos em uma fórmula genérica para o trecho de 5'-terminal (Fórmula-3-5' do Tipo B; 'X₁GCRWG' ao passo que X₁ é 'A' ou está ausente) e do trecho de 3'-terminal (Fórmula-3-3' do Tipo B; 'KRYSCX₄' ao passo que X₄ é 'U' ou

está ausente). Ácidos nucleicos de ligação de SDF-1 do Tipo B 193-G1-002, 193-D2-002, 193-A1-002 e 193-D3-002 têm afinidades de ligação mais fraca para SDF-1 embora partilhem a seqüência de nucleotídeos de núcleo idêntica (Fórmula-2 do Tipo B) com 193-C2-001, 193-G2-001 e 193-F2-001 (Fig. 3). As propriedades de ligação desfavoráveis dos ácidos nucleicos de ligação de SDF-1 do Tipo B 193-G1-002, 193-D2-002, 193-A1-002 e 193-D3-002 podem ser devidas ao número de nucleotídeos e seqüência dos trechos de 5'- e 3'-terminal.

Derivados truncados dos ácidos nucleicos de ligação de SDF-1 do Tipo B 193-G2-001 e 193-C2-001 foram analisados em uma prova de ligação de *pull down* competitiva vs. 193-G2-001 e 193-G2-012, respectivamente (Fig. 4A e 4B). Estes experimentos mostraram que uma redução dos seis terminal nucleotídeos (extremidade 5': **AGCGUG**; extremidade 3': **UACGCU**) de ácidos nucleicos de ligação de SDF-1 do Tipo B 193-G2-001 e 193-C2-001 a cinco nucleotídeos (extremidade 5': **GCGUG**; extremidade 3': **UACGC**) leva 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 a prova de ligação de *pull down* ($K_D = 0,3$ nM, Fig. 18). Uma truncção 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 reduzida afinidade de ligação para SDF-1 a qual foi medida usando a prova de ligação de *pull down* de competição (Fig. 4A). A seqüência de nucleotídeos dos cinco nucleotídeos terminais na extremidade 5'- e 3', respectivamente, tem uma influência sobre a afinidade de ligação de ácidos nucleicos de ligação de SDF-1 do Tipo B. A substituição dos nucleotídeos de 5'- e 3'-terminal '**GCGUG**' e '**UACGC**' (193-C2-002, 193-G2-012) por '**GCGCG**' e '**CGCGC**' (193-G2-013) resultou em uma reduzida afinidade de ligação. Adicionalmente, foram testados os quatro diferentes derivados de ácido nucleico de ligação de SDF-1 do Tipo B 193-G2-001 com uma hélice terminal com uma extensão de quatro nucleotídeos de pareamento de bases (193-G2-014/ -015/ -016/ -017). Todos eles apresentaram reduzida afinidade de ligação a SDF-1 (Fig. 4B). Portanto a seqüência e a

extensão dos nucleotídeos de 5'- e 3'-terminal são essenciais para uma ligação eficaz a SDF-1. Os trechos de 5'-terminal e de 3'-terminal com uma extensão de cinco e quatro nucleotídeos dos derivados de ácidos nucléicos de ligação de SDF-1 do Tipo B 193-C2-003 e 193-G2-012 conforme mostrado na Figs. 4A e 4B podem ser descritos em uma fórmula genérica para o trecho de 5'-terminal ('X₂SSBS', Fórmula-4-5' do Tipo B), por meio da qual X₂ ou está ausente ou é 'G', e do trecho de 3'-terminal ('BVSSX₃', Fórmula-4-3' do Tipo B), e por meio da qual X₃ ou está ausente ou é 'C'. Conforme mostrado para ácidos nucléicos de ligação de SDF-1 do Tipo B 193-G2-001 e 193-C2-01 e seus derivados 193-G2-012 e 193-C2-002 a combinação preferencial de trechos de 5'- e 3'-terminal são 'X₁GCGUG' (trecho de 5'-terminal; Fórmula 5-5' do Tipo B) e 'UACGCX₄' (trecho de 3'-terminal; Fórmula 5-3' do Tipo B), visto que X₁ é ou 'A' ou está ausente e X₄ é 'U' ou está ausente.

No entanto, combinando os trechos de 5'- e 3'-terminal de todos os ácidos nucléicos de ligação de SDF-1 do Tipo B testados a fórmula genérica para o trecho de 5'-terminal de ácidos nucléicos de ligação de SDF-1 do Tipo B é 'X₁X₂SVNS' (Fórmula-6-5' do Tipo B) e a fórmula genérica para o trecho de 3'-terminal ácidos nucléicos de ligação de SDF-1 do Tipo B é 'BVBSX₃X₄' (Fórmula-6-3' do Tipo B), ao passo que

X₁ é 'A' ou está ausente, X₂ é 'G', X₃ é 'C' e X₄ é 'U' ou está ausente;

ou X₁ está ausente, X₂ é 'G' ou está ausente, X₃ é 'C' ou ausente e X₄ está ausente;

1.3 Ácidos nucléicos de ligação de SDF-1 do Tipo C

Conforme representado na Fig. 5 todas as seqüências de ácidos nucléicos de ligação de SDF-1 do Tipo C compreendem uma seqüência de nucleotídeos de núcleo a qual é flanqueada por trechos de 5'- e 3'-terminal que podem hibridizar uns aos outros. No entanto, semelhante hibridização não é necessariamente dada na molécula.

Os ácidos nucléicos foram caracterizados no nível de aptâmeros usando provas de ligação de *pull down* direta e competitiva com D-SDF-1 humano biotilado de modo a classificar os mesmos com respeito a seu

comportamento de ligação (Exemplo 4). Sequências selecionadas foram sintetizadas como Spiegelmeros (Exemplo 3) e foram testadas usando a configuração natural de SDF-1 (L-SDF) em uma prova de quimiotaxia *in vitro* de cultura celular (Exemplo 5) e por medição da ressonância de plasmon superficial usando um instrumento Biacore 2000 (Exemplo 6).

As seqüências das caixas ou trechos definidos podem ser diferentes entre os ácidos nucleicos de ligação de SDF-1 do Tipo C o que influencia a afinidade de ligação a SDF-1. Com base na análise de ligação dos diferentes ácidos nucleicos de ligação de SDF-1 resumida como ácidos nucleicos de ligação de SDF-1 do Tipo C, a seqüência de nucleotídeos de núcleo e sua seqüência de nucleotídeos conforme descrito a seguir são individualmente e mais preferencialmente em sua totalidade essenciais para ligar a SDF-1:

As seqüência de nucleotídeos de núcleo de todas as seqüências identificadas de ácidos nucleicos de ligação de SDF-1 do Tipo C compartilham a seqüência **GGUYAGGGCUHFX_AAGUCGG** (Fórmula-1 do Tipo C), por meio da qual X_A ou está ausente ou é 'A'. Com a exceção de ácido nucleico de ligação de SDF-1 do Tipo C 197-D1 a seqüência de nucleotídeos de núcleo de todas as seqüências identificadas de ácidos nucleicos de ligação de SDF-1 do Tipo C compartilham a seqüência de nucleotídeos **GGU-YAGGGCUHRAAGUCGG** (Fórmula-2 do Tipo C). Ácido nucleico de ligação de SDF-1 do Tipo C 197-D1 (seqüência de nucleotídeos de núcleo: **GGUU-AGGGCUAA-AGUCGG**) faltando um nucleotídeo 'A' dentro da seqüência de nucleotídeos de núcleo e ainda ligando a SDF-1 deixa inferir uma seqüência alternativa de nucleotídeos de núcleo (**GGUYAGGGCUHR-AGUCGG**, Fórmula-3 do Tipo C). Inicialmente, todos os ácidos nucleicos de ligação de SDF-1 do Tipo C conforme representado na Fig. 5 foram analisados em uma prova de ligação de *pull down* competitiva vs. ácido nucleico de ligação de SDF-1 do Tipo A 192-A10-001 (K_D = 1,5 nM determinada por prova de *pull down* e por medições da ressonância de plasmon superficial; IC₅₀ = 0,12 nM). Os ácidos nucleicos de ligação de SDF-1 do Tipo C 191-D5-001, 197-B2, 190-A3-001, 197-H1, 197-H3 e 197-E3 apresentaram afinidades de liga-

ção mais fracas do que 192-A10-001 em experimentos de competição. Afinidade de ligação muito mais fraca foi determinada para 191-A5, 197-B1, 197-D1, 197-H2 e 197-D2 (Fig. 5). As moléculas ou derivados das mesmas foram adicionalmente caracterizadas por provas de ligação de *pull down* competitiva adicionais, medições da ressonância de plasmon e uma prova de quimiotaxia *in vitro*. O ácido nucléico de ligação de SDF-1 do Tipo C 191-D5-001 foi caracterizado por sua afinidade de ligação a SDF-1 humano ao passo que a constante de ligação de equilíbrio K_D foi determinada por medição da ressonância de plasmon superficial ($K_D = 0,8$ nM, Fig. 21). A IC_{50} (concentração inibitória de 50%) de 0,2 nM para 191-D5-001 foi medida usando uma prova de quimiotaxia *in vitro* de cultura celular. A afinidade de ligação de ácido nucléico de ligação de SDF-1 do Tipo C 197-B2 para SDF-1 humano foi determinada por medição da ressonância de plasmon superficial ($K_D = 0,9$ nM), sua IC_{50} (concentração inibitória de 50%) de 0,2 nM foi analisada em uma prova de quimiotaxia *in vitro* de cultura celular. Estes dados indicam que ácidos nucléicos de ligação de SDF-1 do Tipo C 191-D5-001 e 197-B2 têm a afinidade de ligação similar a SDF-1 (Fig. 5 e 8).

Ácido nucléico de ligação de SDF-1 do Tipo C 190-A3-001 (48 nt) compreende um trecho de 5'-terminal de 17 nucleotídeos e um trecho de 3'-terminal de 12 nucleotídeos por meio do qual por um lado os quatro nucleotídeos na extremidade 5' do trecho de 5'-terminal e os quatro nucleotídeos na extremidade 3' do trecho de 3'-terminal podem hibridizar uns aos outros para formar uma hélice de terminal. Alternativamente os nucleotídeos 'UGAGA' no trecho de 5'-terminal pode hibridizar aos nucleotídeos 'UCUCA' no trecho de 3'-terminal para formar uma hélice de terminal. Uma redução para oito nucleotídeos do trecho de 5'-terminal ('GAGAUAGG') e para nove nucleotídeos do trecho de 3'-terminal ('CUGAUUCUC') de molécula 190-A3-001 (por meio da qual seis dos oito / nove nucleotídeos do trecho de 5'- e 3'-terminal podem hibridizar uns aos outros) não tem uma influência sobre a afinidade de ligação a SDF-1 (190-A3-004; Fig. 6 e Fig. 19). A constante de ligação de equilíbrio K_D de 190-A3-004 foi determinada usando a prova de ligação de *pull down* ($K_D = 4,6$ nM, Fig. 20) e por medição da ressonância de

plasmon superficial ($K_D = 4,7$ nM). A IC_{50} (concentração inibitória de 50%) de 0,1 nM para 190-A3-004 foi medida usando uma prova de quimiotaxia *in vitro* de cultura celular (Fig. 22). No entanto, a truncação a dois nucleotídeos no trecho de 5'-terminal leva a uma redução muito forte da afinidade de ligação (190-A3-007; Fig. 6 e Fig. 19).

Os ácidos nucléicos de ligação de SDF-1 do Tipo C 191-D5-001, 197-B2 e 197-H1 (seqüência de nucleotídeos de núcleo: GGUUAGGGCUAGAAGUCGG), 197-H3/191-A5 (seqüência de nucleotídeos de núcleo: GGUUAGGGCU^{GA}GAAGUCGG) e 197-E3/197-B1 (seqüência de nucleotídeos de núcleo: GGUUAGGGCU^UGAAGUCGG) compartilham uma seqüência de nucleotídeos de núcleo quase idêntica (Fórmula-4 do Tipo C; seqüência de nucleotídeos: GGUUAGGGCU^HGAAGUCGG). 191-D5-001, 197-B2 e 197-H1 não compartilham um trecho similar de 5'- e 3'-terminal (197-H3 e 197-E3 têm o trecho de 5'- e 3'-terminal idêntico a 197-B2). No entanto, o respectivos dez (197-B2, 197-E3, 197-H3) ou nove dos dez (191-D5-001, 197-H1) nucleotídeos do trecho de 5'-terminal podem hibridizar aos respectivos dez (197-B2, 197-E3, 197-H3) ou nove dos dez (191-D5-001, 197-H1) nucleotídeos do trecho de 3'-terminal (Fig. 5). Portanto, o trecho de 5'-terminal dos ácidos nucléicos de ligação de SDF-1 do 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 seqüência de nucleotídeos genérica comum de 'RKS^BUSNVGR' (Fórmula-5-5' do Tipo C). O trecho de 3'-terminal dos ácidos nucléicos de ligação de SDF-1 do 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 compreende uma seqüência de nucleotídeos genérica comum de 'Y^NNR^CASSMY' (Fórmula-5-3' do Tipo C), por meio da qual os trechos de 5' e o 3'-terminal de ácidos nucléicos de ligação de SDF-1 do Tipo C 197-B2, 191-D5-001, 197-H1, 197-E3 e 197-H3 são preferenciais. Estes trechos de 5'- e 3'-terminal preferenciais de ácidos nucléicos de ligação de SDF-1 do Tipo C 197-B2, 191-D5-001, 197-H1, 197-E3 e 197-H3 podem ser resumidos na fórmula genérica 'RKS^BUGSVGR' (Fórmula-6-5' do Tipo C; trecho de 5'-

terminal) e 'YCNRCASSMY' (Fórmula-6-3' do Tipo C; trecho de 3'-terminal).

Derivados truncados de ácido nucléico de ligação de SDF-1 do Tipo C 191-D5-001 foram construídos e testados em uma prova de ligação de *pull down* competitiva vs. a molécula original 191-D5-001 (Fig. 7A, Fig. 7B e Fig. 19). Primeiro a extensão dos trechos de 5'- e 3'-terminal foram encurtadas de dez nucleotídeos (191-D5-001) cada para sete nucleotídeos cada (191-D5-004) conforme representado na Fig. 7A por meio da qual nove dos (191-D5-001) ou seis dos sete nucleotídeos (191-D5-004) do trecho de 5'-terminal e do trecho de 3'-terminal, respectivamente podem hibridizar uns aos outros. A redução para sete nucleotídeos do trecho de 5'- e 3'- terminal respectivamente (ao passo que seis dos sete nucleotídeos podem hibridizar uns aos outros) levou a reduzida afinidade de ligação para SDF-1 (191-D5-004). Os trechos terminais de ácido nucléico de ligação de SDF-1 do Tipo C 191-D5-004 foram modificados por meio da qual o nucleotídeo não pareando te 'A' dentro do trecho de 3'-terminal de 191-D5-004 foi substituído por um 'C' (191-D5-005). Esta modificação levou a um aprimoramento da ligação. Este derivado, ácido nucléico de ligação de SDF-1 do Tipo C 191-D5-005, apresentou ligação a SDF-1 similar a 191-D5-001. Truncação adicional do trecho de 5'- e 3'-terminal a cinco nucleotídeos respectivamente levou a uma molécula com uma extensão total de 29 nucleotídeos (191-D5-007). Devido às similaridades de 191-D5-001 e dos ácidos nucléicos de ligação de SDF-1 do Tipo C 197-B2, 191-D5-001, 197-H1, 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 presumir que o trecho de 5'- e de 3'-terminal pode em princípio ser truncado para baixo para cinco nucleotídeos por meio da qual a sequência de nucleotídeos 'CGGGA' para o trecho de 5'-terminal e 'UCCCG' para o trecho de 3'-terminal foi testado com sucesso (ácido nucléico de ligação de SDF-1 do Tipo C 191-D5-007 ~~040~~). Ácido nucléico de ligação de SDF-1 do Tipo C 191-D5-007 liga surpreendentemente um tanto melhor a SDF-1 do que 191-D5-001 (determinado no nível de aptâmeros usando a prova de ligação de competição). A constante de ligação de equilíbrio K_D de 191-D5-007 foi determinada usando a prova de ligação de *pull down* ($K_D = 2,2$ nM,

Fig. 20) e por medição da ressonância de plasmon superficial ($K_D = 0,8$ nM, Fig. 21). A IC_{50} (concentração inibitória de 50%) de 0,1 nM para 191-D5-007 foi medida usando uma prova de quimiotaxia *in vitro* de cultura celular. Truncção adicional de ambos os trechos terminais para quatro nucleotídeos (191-D5-010, Fig.7A).

Derivados adicionais de ácido nucléico de ligação de SDF-1 do Tipo C 191-D5-001 (191-D5-017/ -024/ -029) portando trechos de 5'- e 3'-terminal de respectivamente quatro nucleotídeos também apresentaram reduzida afinidade de ligação para SDF-1 na prova de ligação de *pull down* de competição vs. 191-D5-007 (Fig. 7B). Trechos alternativos de 5'- e 3'-terminal com uma extensão de respectivamente cinco nucleotídeos foram adicionalmente testados, 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 derivados para o trecho de 5'-terminal é 'X_SSSSV' (Fórmula-7-5' do Tipo C) e para o trecho 3' é 'BSSSX_S' (Fórmula-7-3' do Tipo C), por meio da qual X_S está ausente ou ,S'. Duas das cinco variantes testadas apresentaram idêntica afinidade de ligação a SDF-1 que 191-D5-007 (191-D5-024-29a, 191-D5-024-29b; Fig. 7B). As seqüências dos trechos de 5'-terminal e 3'-terminal dos derivados 191-D5-001 que mostram a melhor afinidade de ligação a SDF-1 e compreendem um trecho de 5'-terminal e 3'-terminal de cinco nucleotídeos respectivamente (191-D5-007, 191-D5-024-29a, 191-D5-024-29b) podem ser resumidas em uma fórmula genérica (trecho de 5'-terminal: 'SGGSR', Fórmula-8-5' do Tipo C; trecho de 3'-terminal: , YSCCS', Fórmula-8-3' do Tipo C).

Derivados truncados de ácido nucléico de ligação de SDF-1 do Tipo C 197-B2 foram analisados em uma prova de ligação de *pull down* competitivo versus a molécula original 197-B2 e 191-D5-007 (Fig. 8). Usando a prova de ligação de *pull down* competitivo versus 191-D5-007 foi mostrado que 197-B2 tem a mesma afinidade de ligação para SDF-1 que 191-D5-007. Os trechos de 5'- e 3'-terminal foram encurtados sem perda de afinidade de ligação a partir de dez nucleotídeos (197-B2) cada a cinco nucleotídeos cada (197-B2-005) por meio da qual os nucleotídeos do trecho de 5'-terminal e do

trecho de 3'-terminal podem hibridizar completamente um ao outro. Se o trecho de 5'-terminal ('GCGGG') e 3'-terminal ('CCUGC') de 197-B2-005 foi substituído por 'GCCGG' (trecho de 5'-terminal) e por 'CCGGC' (trecho de 3'-terminal) de 197-B2-006, a afinidade de ligação a SDF-1 persistiu totalmente. Como 197-B2 e 191-D5-001 (e seus derivados) compartilham a sequência de nucleotídeos de núcleo idêntica (GGUUAGGGCUAGAA-GUCGG) e vários derivados de 191-D5 com trechos de 5'- e 3'-terminal com uma extensão de respectivamente quatro nucleotídeos foram testados, uma truncação adicional do trecho de 5'- e 3'-terminal foi omitida. Dois derivados adicionais foram designados que compreendem seis nucleotídeos na extremidade 5' e 3' (trechos de 5'- e 3'-terminal) respectivamente. A afinidade de ligação a SDF-1 de ambas as moléculas (197-B2-006-31a e 197-B2-006-31b) é a mesma que mostrado para 191-D5-007 e 197-B2-006 (Fig. 8). As seqüências dos trechos de 5'-terminal e 3'-terminal de 197-B2 derivados que mostram a melhor afinidade de ligação para SDF-1 e compreendem um trecho de 5'-terminal e 3'-terminal de cinco nucleotídeos respectivamente podem ser resumidas em uma fórmula genérica (trecho de 5'-terminal: 'GCSGG', Fórmula-9-5' Tipo C; trecho de 3'-terminal: 'CCKGC', Fórmula-9-3' Tipo C).

Combinando os trechos 5' e 3' de derivados truncados de ácidos nucléicos de ligação de SDF-1 do Tipo C 191-D5-001 (trecho de 5'-terminal: 'SGGSR', Fórmula-8-5' Tipo C; trecho de 3'-terminal: 'YSCCS', Fórmula-8-3' Tipo C) e 197-B2 (trecho de 5'-terminal: 'GCSGG', Fórmula-9-5' Tipo C; trecho de 3'-terminal: 'CCKGC', Fórmula-9-3' Tipo C) a fórmula genérica preferencial comum para o trecho de 5'-terminal e o 3'-terminal é 'SSSSR' (trecho de 5'-terminal, Fórmula-10-5' Tipo C) e 'YSBSS' (trecho de 3'-terminal: Fórmula-10-3' Tipo C).

1.4 ácidos nucléicos de ligação de SDF-1 adicionais

Adicionalmente, foram identificados três ácidos nucléicos de ligação de SDF-1 adicionais que não compartilham os motivos de ligação de SDF-1 de 'Tipo A', 'Tipo B' e 'Tipo C'. Eles foram analisados como aptâmeros usando a prova de ligação de *pull down* (Fig. 9).

Deve ser entendido que quaisquer das seqüências mostradas nas Figs. 1 a 9 são ácidos nucleicos de acordo com a presente invenção, incluindo as formas truncadas das mesmas e as também incluindo as formas estendidas das mesmas com a condição, no entanto, de que as moléculas de ácido nucleico deste modo truncadas e estendidas, respectivamente, ainda são capazes de ligar ao alvo.

Exemplo 2: 40kda-PEG e outra Modificação de Spiegelmeros ligado SDF

De modo a prolongar a duração da permanência plasmática de Spiegelmeros *in vivo*, os Spiegelmeros 193-G2-012, 192-A10-008, 191-D5-007, 197-B2-006 e 197-B2-006-31b foram ligados de modo covalente a uma porção de 40 kDa de polietileno glicol (PEG) na extremidade 5' conforme descrito no capítulo 3 (clones PEGuilados: 193-G2-012-5'-PEG, 192-A10-008-5'PEG, 191-D5-007-5'PEG, 197-B2-006-5'PEG e 197-B2-006-31b-5'PEG).

As moléculas de Spiegelmeros PEGuilados foram analisadas em uma prova TAX de cultura celular *in vitro* (Capítulo 5) e por medições da ressonância de plasmon usando um Biacore (Capítulo 6). Todos os Spiegelmeros modificados com 40 kDa-PEG ainda são capazes de inibir quimiotaxia induzida por SDF-1 e ligar a SDF-1 em baixa faixa nanomolar (Fig. 23A, 23B, 24A e Fig. 24B).

Adicionalmente, Spiegelmero 192-A10-001 ligando SDF foi modificado com 40kDa-PEG, 30 kDa-PEG, 100kDa-HES ou 130 kDa-HES (clones PEGuilados: 192-A10-001-5'PEG40, 192-A10-001-5'PEG30, 192-A10-001-5'HES100, 192-A10-001-5'HES130; procedimento de ligação no capítulo 3). Conforme representado na Fig. 25A e na Fig. 25B nem uma porção PEG ou uma porção HES tem uma influência sobre a potência de Spiegelmeros para inibir quimiotaxia induzida por SDF-1.

Exemplo 3: Síntese e derivação de Aptâmeros e Spiegelmeros

3.1 SÍNTESE EM PEQUENA ESCALA

Aptâmeros e Spiegelmeros foram produzidos por síntese de fase sólida com um sintetizador ABI 394 (Applied Biosystems, Foster City, CA,

EUA) usando química de fosforamidita de 2'TBDMS RNA (Damha and Ogilvie, 1993). rA(N-Bz)-, rC(Ac)-, rG(N-ibu)-, e rU- fosforamiditas na configuração D- e L- foram adquiridas da ChemGenes, Wilmington, MA. Aptâmeros e Spiegelmeros foram purificados por eletroforese de gel.

5 **3.2 SÍNTESE EM LARGA ESCALA MAIS MODIFICAÇÃO**

Os Spiegelmeros foram produzidos por síntese de fase sólida com um sintetizador ÄktaPilot100 (Amersham Biosciences; General Electric Healthcare, Freiburg) usando química de fosforamidita de 2'TBDMS RNA (Damha and Ogilvie, 1993). L-rA(N-Bz)-, L-rC(Ac)-, L-rG(N-ibu)-, e L-rU- fosforamiditas foram adquiridas da ChemGenes (Wilmington, MA, EUA). O 5'-amino-modificador foi adquirido da American International Chemicals Inc. (Framingham, MA, EUA). A síntese dos Spiegelmeros foi iniciada sobre L-riboG; L-riboC, L-riboA, L-riboU respectivamente modificou CPG tamanho de poro de 1000 Å (Link Technology, Glasgow, Reino Unido). Para acoplamento (15 min por ciclo), 0,3 M de benziltiotetrazol (American International Chemicals Inc., Framingham, MA, EUA) em acetonitrilo, e 3,5 equivalentes da solução respectiva a 0,2 M de fosforamidita em acetonitrilo foi usado. Foi usado um ciclo de capeamento de oxidação. Solventes e reagentes de rotina para síntese de oligonucleotídeo foram adquiridos da Biosolve (Valkenswaard, Países Baixos). Os Spiegelmeros foram sintetizados DMT-ON; depois de desproteção, foi purificado através de RP-HPLC do preparativo (Wincott F. *et al.*, 1995) usando meio Source15RPC (Amersham). O grupo 5'DMT foi removido com 80% de ácido acético (90 min em temperatura ambiente). Subseqüentemente, solução aquosa a 2 M de NaOAc foi adicionada e o Spiegelmero foi dessalgado por filtração de fluxo tangencial usando uma membrana de celulose regenerada 5 K (Millipore, Bedford, MA).

25 **3.3 PEGUILAÇÃO**

De modo a prolongar a duração da permanência plasmática dos Spiegelmeros *in vivo*, os Spiegelmeros foram acoplados de modo covalente a uma porção de 40 kDa de polietileno glicol (PEG) na extremidade 5'.

Para PEGuilação (para detalhes técnicos do método para PEGuilação vide o requerimento de patente Européia No. EP 1 306 382), os

Spiegelmeros 5'-amino modificados purificados foram dissolvidos em uma mistura de H₂O (2,5 ml), DMF (5 ml), e tampão A (5 ml; preparado misturando ácido cítrico • H₂O [7 g], ácido bórico [3,54 g], ácido fosfórico [2,26 ml], e 1 M de NaOH [343 ml] e adicionando água para um volume final de 1 l; pH = 8.4 foi ajustado com 1 M de HCl).

O pH da solução de Spiegelmero foi trazido para 8.4 com 1 M de NaOH. Em seguida, 40 kDa de PEG-NHS éster (Nektar Therapeutics, Huntsville, AL) foi adicionado a 37°C a cada 30 min em seis porções de 0,25 equivalentes até uma produção máxima de 75 a 85% ser atingida. O pH da mistura da reação foi mantido a 8 a 8.5 com 1 M de NaOH durante adição do PEG-NHS éster.

A mistura da reação foi combinada com 4 ml de solução de uréia (8 M), e 4 ml de tampão B (0,1 M de acetato de trietilamônio em H₂O) e aquecida até 95°C por 15 min. O Spiegelmero PEGuilado foi em seguida purificado por RP-HPLC com meio Source 15RPC (Amersham), usando um gradiente de acetonitrilo (tampão B; tampão C: 0,1 M de acetato de trietilamônio em acetonitrilo). Excesso de PEG elutriou a 5% de tampão C, Spiegelmero PEGuilado a 10 a 15% de tampão C. Frações de produto com uma pureza de >95% (conforme avaliado por HPLC) foram combinadas e misturadas com 40 ml de NaOAc a 3 M. O Spiegelmero PEGuilado foi dessalgado por filtração de fluxo tangencial (membrana de celulose regenerada 5 K, Millipore, Bedford MA).

3.4 HESilação

De modo a prolongar a duração da permanência plasmática de Spiegelmeros *in vivo*, os Spiegelmeros foram acoplados de modo covalente a Hidroxil Étil Amido (HES) de vários pesos moleculares de >130 kDa e grau de substituição >0,5. A extremidade 5' do Spiegelmero é o sítio preferencial para conjugação.

Para HESilação (para detalhes técnicos do método para Hesilação de ácidos nucleicos vide o requerimento de patente alemã No. German Offenlegungsschrift DE 101 12 825 A1, e para D/L-ácidos nucleicos vide o requerimento de patente internacional No. PCT WO 02/080979 A2), o Spie-

gelmero 5'-amino modificado purificado foi dissolvido em bicarbonato de sódio (0,3 M, 1 ml) e o pH é ajustado para 8.5.

Em respeito ao Spiegelmero, um excesso de 5 vezes do ácido HES livre (3,3 mmol, Supramol, Rosbach, Alemanha) e di(N-succinimidil) 5 carbonato (3,3 mmol) foram adicionados a N,N-dimetilformamida (1 ml) para produzir uma solução do éster de N-hidroxisuccimida ativado de HES. Para dissolver todos os reagentes a mistura foi agitada brevemente a 60°C, resfriada até 25 °C e em seguida agitada por 1,5 h a 25 °C. A solução de Spiegelmero foi adicionada à solução de HES ativado, e a mistura resultante foi 10 agitada a 25°C e pH 8.5. A reação foi monitorada por IEX-HPLC analítica. Tipicamente a conjugação prosseguiu até >75 % dentro de 1 hora.

Para purificação por IEX-HPLC através de meio Source 15Q (GE, Freiburg, Alemanha) A mistura da reação foi combinada com uma quantidade de 10 vezes de tampão A (1 mM de EDTA, 25 mM de Tris, 10 15 mM de NaClO₄ em água / acetonitrilo a 9:1, pH 4). Excesso de HES elutria a 5% de tampão A (1 mM de EDTA, 25 mM de Tris, 500 mM de NaClO₄ em água / acetonitrilo a 9:1, pH 4), ao passo que o conjugado HES-Spiegelmero elutria a 20 a 30% de tampão B. Frações de produto com uma pureza de >95% (conforme avaliado por HPLC) foram combinadas e dessalgadas por 20 filtração de fluxo tangencial (membrana de celulose regenerada 5 K, Millipore, Bedford MA).

Exemplo 4: Determinação de constantes de ligação (Prova de ligação de *pull down*)

4.1 Prova de ligação de pull down direta

25 A afinidade de aptâmeros para D-SDF-1 humano biotinilado foi medida em um formato de prova de ligação de *pull down* a 37°C. Aptâmeros foram marcados com 5'-fosfato por T4 polinucleotídeo quinase (Invitrogen, Karlsruhe, Alemanha) usando ATP marcada com [γ -³²P] (Hartmann Analytic, Braunschweig, Alemanha). A radioatividade específica de aptâmeros marca- 30 dos foi 200.000 a 800.000 cpm/pmol. Aptâmeros foram incubados depois de desnaturação e renaturação em concentração de 10, 20, 30 ou 40 pM a 37°C em tampão de seleção (20 mM de Tris-HCl pH 7.4; 137 mM de NaCl; 5

mM de KCl; 1 mM de MgCl₂; 1 mM de CaCl₂; 0,1% [peso/ vol] de Tween-20) junto com quantidades variáveis de D-SDF-1 humano biotinilado por 4 a 12 horas de modo a atingir equilíbrio em baixas concentrações. Tampão de seleção foi suplementado com 10 µg/ml de albumina sérica humana (Sigma-
5 Aldrich, Steinheim, Alemanha), e 10 µg/ml de RNA de levedura (Ambion, Austin, EUA) de modo a prevenir adsorção de parceiros de ligação com superfícies de plasticware usadas ou a matriz de imobilização. A faixa de concentração de D-SDF-1 humano biotinilado foi ajustada de 8 pM a 100 nM; o volume total da reação foi de 1 ml. Peptídeo e complexos de peptídeo-
10 aptâmero foram imobilizados sobre 1,5 µl de partículas Streptavidin Ultralink Plus (Pierce Biotechnology, Rockford, EUA) as quais tinham sido pré-equilibradas com tampão de seleção e ressuspendidas em um volume total de 6 µl. As partículas foram mantidas em suspensão por 30 min na temperatura respectiva em um termomisturador (*thermomixer*). A radioatividade imo-
15 bilizada foi quantificada em um contador de cintilação depois de destacar o sobrenadante e apropriada lavagem. A percentagem de ligação foi plotada contra a concentração de D-SDF-1 humano biotinilado e foram obtidas constantes de dissociação usando algoritmos do programa (GRAFIT; Erithacus Software; Surrey, Reino Unido) presumindo uma estequiometria de 1:1.

20 **4.2 Prova de ligação de pull down competitiva**

De modo a comparar diferentes aptâmeros de ligação de D-SDF-1, foi realizada uma prova de classificação competitiva. Para esta finalidade o aptâmero mais *affine* disponível foi marcado radioativamente (vide acima) e serviu como referência. Depois de desnaturação e renaturação foi incuba-
25 do a 37°C com D-SDF-1 humano biotinilado em 1 ml de tampão de seleção em condições que resultaram em torno de 5 a 10 % de ligação ao peptídeo depois de imobilização e lavagem sobre agarose NeutrAvidin ou Streptavidin Ultralink Plus (ambos da Pierce) sem competição. Um excesso de variantes de aptâmero de D-RNA não marcado desnaturado e renaturado foi adiciona-
30 do a diferentes concentrações (por exemplo, 2, 10, e 50 nM) com o aptâmero de referência marcado para reações de ligação paralela. O aptâmeros a ser testado competiu com o aptâmero de referência para ligação alvo, deste

modo diminuindo o sinal de ligação em dependência de suas características de ligação. O aptâmero que foi considerado mais ativo neste teste pode então servir como uma nova referência para análise comparativa de variantes de aptâmeros adicionais.

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

Células de leucemia de células T humanas Jurkat (obtidas da DSMZ, Braunschweig) foram cultivadas a 37°C e 5% de CO₂ em meio RPMI 1640 com Glutamax (Invitrogen, Karlsruhe, Alemanha) o qual contém 10% de soro bovino fetal, 100 unidades/ml de penicilina e 100 µg/ml de estreptom-
10 micina (Invitrogen, Karlsruhe, Alemanha). Um dia antes do experimento, as células foram semeadas em um novo frasco com uma densidade de 0,3 x 10⁶/ml (9 x 10⁶/30 ml) em meio de rotina (Invitrogen, Karlsruhe, Alemanha).

Para o experimento, as células foram centrifugadas (5 min a
15 300g), ressuspensas, contadas e lavadas uma vez com 15 ml de HBH (solução salina balanceada de Hanks contendo 1 mg/ml de albumina sérica bovina e 20 mM de HEPES; Invitrogen, Karlsruhe, Alemanha). Em seguida as células foram ressuspensas a 3 x 10⁶/ml ou 1,33 x 10⁶/ml, dependendo do tipo de placa de filtro usada. Em seguida as células foram deixadas para
20 migrar através das membranas porosas das placas de filtro por várias horas para uma solução contendo SDF-1 e várias quantidades de Spiegelmero. Foram usados ou placas Transwell e insertos com membrana de Policarbonato porosa, tamanho de poro de 5 µm (Corning; 3421) ou placas MultiScre-
en MIC (Millipore, MAMIC5S10).

25 5.1 Protocolo para placas Transwell

As soluções de estimulação (SDF-1 + várias concentrações de Spiegelmero) foram preparadas em 600 µl de HBH nos compartimentos infe-
riores das placas Transwell e incubadas por 20 a 30 min. Todas as condi-
ções foram dispostas no mínimo duas vezes. Os insertos foram transferidos
30 para as cavidades contendo as soluções de estimulação e 100 µl de uma suspensão celular com 3 x 10⁶/ml foram adicionadas aos insertos (3 x 10⁵ células/ cavidade). Em seguida as células foram deixadas para migrar por 3

h a 37°C.

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

10 **5.2 Protocolo para lâminas Millipore MultiScreen**

As soluções de estimulação (SDF-1 + várias concentrações de Spiegelmero) foram preparadas como 10X soluções em uma lâmina de 96 tubos de 0,2 ml de perfil baixo. 135 µl de HBH foram pipetados para dentro dos compartimentos inferiores da lâmina *MultiScreen* e foram adicionados 15
15 µl das soluções de estimulação. All condições were made up como triplicates. Depois de 20 a 30 min a placa de filtro foi inserida na placa contendo as soluções de estimulação e 75 µl de uma suspensão celular com $1,33 \times 10^6$ /ml foram adicionados às cavidades da placa de filtro (1×10^5 células/cavidade). As células foram em seguida deixadas para migrar por 3 h a
20 37°C.

Depois disso, a lâmina do inserto é removida e 20 µl de solução de trabalho de resazurin (440 µM em PBS) são adicionados às cavidades inferiores. As lâminas foram em seguida incubadas a 37°C por 2,5 a 3 horas.

Depois de incubação, 100 µl de cada cavidade foram transferi-
25 das para uma lâmina de 96 cavidades preta. Foi realizada medição dos sinais de fluorescência conforme descrito acima.

5.3 Avaliação

Para avaliação, valores de fluorescência foram corrigidos para fluorescência de fundo (sem células na cavidade). Em seguida foi calculada
30 a diferença entre condições experimentais com e sem SDF-1. O valor para a amostra sem Spiegelmero (SDF-1 somente) foi determinado 100% e os valores para as amostras com Spiegelmero foram calculados como percentagem

disto. Para uma curva de dose-resposta os valores de percentagem foram plotados contra concentração de Spiegelmero e o valor da IC_{50} (concentração de Spiegelmero na qual está presente 50% da atividade sem Spiegelmero) foi determinado graficamente a partir da curva resultante.

5 **5.4 Resultados**

5.4.1 Estimulação dose dependente de células por SDF-1 humano

Foi visto que SDF-1 humano estimula a migração de células Jurkat em uma maneira dose dependente, com estimulação meia-máxima a cerca de 0,3 nM (Fig. 11).

10 5.4.2 Inibição dose dependente de quimiotaxia induzida por SDF-1 humano por Spiegelmeros de ligação de SDF-1

Quando as células foram deixadas para migrar para uma solução contendo SDF-1 humano mais concentrações crescentes de Spiegelmeros de ligação de SDF-1, foi observada inibição dose-dependente. As IC_{50} s respectivas dos Spiegelmeros testados são especificadas no Exemplo 1. Quando foi usado um Spiegelmero Controle inespecífico ao invés de Spiegelmeros de ligação de SDF-1, não foi observado efeito inibitório até 1 μ M (Fig. 26).

15 5.4.3 Inibição dose dependente de quimiotaxia induzida por SDF-1 de camundongo, por Spiegelmeros ligando SDF-1

SDF-1 é bem conservado entre as espécies: SDF-1 de camundongo difere de SDF-1 α humano em um aminoácido (isoleucina na posição 18 ao invés de valina). SDF-1 murino pode estimular quimiotaxia de células Jurkat (Fig. 27) e foi visto que esta ação é inibida por Spiegelmeros 192-A10-001 e 191-D5-007-5'-PEG com a mesma potência como no caso de SDF-1 humano (Fig. 28).

Exemplo 6: Análise de Ligação por Medição da Ressonância de Plasmon Superficial

30 O instrumento Biacore 2000 (Biacore AB, Uppsala, Suécia) foi usado para analisar a ligação de Spiegelmeros a SDF-1 humano. Quando a ligação de SDF-1 devia ser obtida através de grupamentos amina, SDF-1 foi dialisado contra água por 1 a 2 horas (Millipore VSWP ésteres celuló-

sicos mistos; tamanho de poro, 0,025 μM) para remover aminas interferentes. Chips sensores CM4 (Biacore AB, Uppsala, Suécia) foram ativados antes de ligação de proteína por uma injeção de 35 μl de uma diluição a 1:1 de NHS a 0,4 M e EDC a 0,1 M em um fluxo de 5 $\mu\text{l}/\text{min}$. Quimocina foi em seguida injetada em concentrações de 0,1 a 1,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ em um fluxo de 2 $\mu\text{l}/\text{min}$ até a resposta do instrumento estar na faixa de 1000 a 2000 RU (unidades relativas). Ésteres de NHS não reagidos foram desativados por injeção de 35 μl de solução de cloridreto de etanolamina (pH 8.5) em um fluxo de 5 $\mu\text{l}/\text{min}$. O chip sensor foi primed duas vezes com tampão de ligação e equilibrado a 10 $\mu\text{l}/\text{min}$ por 1 a 2 horas até a linha basal parecer estável. Para todas as protepubas, parâmetros cinéticos e constantes de dissociação foram avaliados por uma série de injeções de Spiegelmero em concentrações de 1000, 500, 250, 125, 62,5, 31,25, e 0 nM em tampão de seleção (Tris-HCl, 20 mM; NaCl, 137 mM; KCl, 5 mM; CaCl_2 , 1 mM; MgCl_2 , 1 mM; Tween20, 0,1% [peso/ vol]; pH 7.4). Em todos os experimentos, a análise foi realizada a 37°C usando o comando Kinject definindo um tempo de associação de 180 e um tempo de dissociação de 360 segundos em um fluxo de 10 $\mu\text{l}/\text{min}$. Foi feita análise dos dados e cálculo das constantes de dissociação (K_D) com o software BIAevaluation 3.0 (BIAcore AB, Uppsala, Suécia) usando o algoritmo de ajustamento estequiométrico de Langmuir a 1:1.

Exemplo 7: Inibição, de ligação de [^{125}J]-SDF-1 a células expressando CXCR4, por Spiegelmeros de ligação de SDF-1

7.1 Método

Um clone de cDNA codificando para CXCR4-receptor humano (NM_003467.2) foi adquirido da OriGene Technologies (Rockville, MD) e clonado no pCR3.1-vector (Invitrogen, Karlsruhe, Alemanha). O vetor resultante foi transfectado em células CHO-K1 (DSMZ, Braunschweig, Alemanha) usando Lipofectamin 2000 (Invitrogen) e linhagens celulares de expressão estável foram selecionadas por tratamento com geneticina. A expressão de receptores foi verificada por RT-PCR.

Para provas de ligação células expressando CXCR4 foram semeadas em lâminas de 24 cavidades revestidas com polilisina em uma den-

cidade celular de 1×10^5 células/ cavidade e cultivadas de um dia para o outro a 37°C e 5% de CO₂ em meio CHO-Ultra (Cambrex, Verviers, Bélgica) contendo 50 unidades/ml de penicilina, 50 µg/ml de estreptomicina e 0.5 mg/ml de geneticina.

5 Para o experimento de ligação, o meio foi removido e as células foram lavadas uma vez com solução salina balanceada de Hanks, contendo adicionalmente 20 mM de HEPES, 1 mg/ml de albumina sérica bovina, 0,1 mg/ml de bacitracin (HBB). Em seguida as células foram incubadas em 0,2 ml de HBB por 1 h em temperatura ambiente junto com 50 pM de [¹²⁵J]-SDF-1 (PerkinElmer, Rodgau, Alemanha) e concentrações variáveis de Spiegel-
10 mero.

Lgação não-específica foi determinada adicionando SDF-1 humano não marcado (R & D Systems, Wiesbaden, Alemanha) para uma concentração final de 0,5 µM a várias cavidades.

15 Depois do período de incubação o sobrenadante foi removido e as cavidades foram lavadas 3 vezes com HBB gelado. Depois disso as células foram lisadas com 0,1 ml de NaOH a 0,1 M. Os lisados foram transferidos para frascos de cintilação e depois da adição de 4 ml de coquetel de cintilação Unisafe 1 Liquid Szintillation (Zinsser, Frankfurt, Alemanha) foram
20 contados em um contador de cintilação Beckman LS6500.

Como os valores para ligação não-específica (ligação na presença de quantidade elevada de SDF-1 não marcado) foram um tanto maiores do que os valores para ligação total na presença de altas concentrações (500 pM) de Spiegelmero, a diferença entre ligação máxima ("max") e ligação na presença de 500 pM de Spiegelmero foi usada para cálculo dos valores da IC₅₀.

7.2 Resultados

Plotagem de [¹²⁵J]-SDF-1 ligado contra concentração de Spiegelmeros revelou que a ligação de SDF-1 pode ser bloqueada por Spiegel-
30 mero 192-A10-001 com uma IC₅₀ de cerca de 60 pM (Fig. 29).

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

8.1 Método

Células CHO expressando CXCR4 foram semeadas em lâminas de 6 cavidades em uma densidade de $0,5 \times 10^6$ células/ cavidade e cultivadas por cerca de três horas a 37°C e 5% de CO₂ em meio CHO-Ultra (Cambrex, Verviers, Bélgica) contendo 50 unidades/ml de penicilina, 50 µg/ml de estreptomicina e 0,5 mg/ml de geneticina. Depois de fixação celular o meio foi removido e substituído por meio F12 de Ham contendo 50 unidades/ml de penicilina, 50 µg/ml de estreptomicina. Em seguida as células foram incubadas de um dia para o outro a 37°C e 5% de CO₂. Três horas antes da estimulação o meio foi substituído mais uma vez por meio fresco F12 de Ham. As células foram estimuladas com 1 nM de SDF-1 humano e várias quantidades de Spiegelmero por 5 ou 10 minutos. Depois disso o meio foi removido e as células foram rapidamente lavadas uma vez com 1 ml de salina tamponada com fosfato gelada (PBS), seguida por lise com tampão de amostra SDS (Tris/HCl, pH 6.8, 62,5 mM; glicerol, 10%; SDS, 2%; azul bromofenol, 0,01 %; beta-mercaptoetanol, 5%). 1 µl de 0,5 u/µl de Benzonase (Merck, Darmstadt, Alemanha) foi adicionado a cada cavidade e depois de incubação por 5 a 10 min em temperatura ambiente, os lisados foram transferidos para tubos Eppendorf, incubados a 95°C por 5 min e armazenados a -20°C até análise posterior.

25 µl dos lisados foram separados sobre 10% de géis de SDS-poliacrilamida desnaturante. Em seguida as proteínas foram transferidas por electroblotting sobre membranas de nitrocelulose HybondECL (Amersham/GE Healthcare, Munich, Alemanha). Depois de blotting, as membranas foram coradas com vermelho de Ponceau (0,2% em 3% de ácido tricloroacético) para controle da carga protéica 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 em pó sem gordura a 2 a 8°C de um dia para o outro.

Em seguida a membrana foi incubada com um anticorpo anti-Fosfo-MAP-quinase de coelho (1:1000 em 10% de leite em TBS-T) por 2 h em temperatura ambiente. Depois de lavar três vezes por 5 min com TBS-T,

a membrana foi incubada com anti-coelho-IgG-HRP-conjugado (1:2000 em 10% de leite em TBS-T) por 1 h em temperatura ambiente. Em seguida a membrana foi novamente lavada três vezes por 5 min com TBS-T, seguida por incubação por 1 min em reagente quimiluminescente LumiGlo^R. A luminescência foi detectada por exposição a filmes de quimiluminescência HyperfilmTMECL (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 Kinase (Thr202/Tyr204) Antibody da Cell Signaling Technology (New England Biolabs, Frankfurt a.M., Alemanha).

10 **8.2 Resultados**

Estimulação de células expressando CXCR4 com 1 nM de SDF-1 humano por 5 min levou a uma profunda estimulação de MAP-quinase, indicada por um aumento na intensidade da banda refletindo MAP-quinase ativada. Esta ativação de MAP-quinase pode ser inibida de modo dose-dependente pelo Spiegelmero 191-A10-001 (Fig. 30).

Exemplo 9: Análise funcional de Spiegelmero 193-G2-012-5'-PEG de ligação de SDF-1 humano em uma prova de germinação de anel aórtico

Para testar se Spiegelmero 193-G2-012-5'-PEG de ligação de SDF-1 humano é funcional também em uma prova de cultura de órgãos de angiogênese de rotina, foram realizadas provas de germinação de anel aórtico. Esta prova, na qual são avaliadas a extensão e a abundância de extensões semelhantes a vaso dos explantes, se tornou o modelo de cultura de órgãos mais amplamente usado para angiogênese (Auerbach et al. 2003). Já foi mostrado que SDF-1 induz germinação neste tipo de prova (Salcedo et al. 1999).

Aortas de ratos foram cortadas em anéis, embutidas em uma matriz de colágeni e incubadas com SDF-1 e SDF-1 mais Spiegelmero 193-G2-012-5'-PEG de ligação de SDF-1 humano ou SDF mais um Spiegelmero Controle PEGuilado não-funcional que não liga SDF-1. Depois de 6 a 7 dias, a germinação (isto é, desenvolvimento de células endoteliais) foi analisada tirando fotografias e determinando um índice de germinação.

Método

Aortas de ratos machos foram obtidas da Bagheri Life sciences (Berlin, Alemanha). As aortas foram preparadas recentemente e transportadas sobre gelo em meio MCDB 131-Medium (Invitrogen, Karlsruhe, Alemanha) contendo 50 unidades/ml de penicilina, 50 µg/ml de estreptomicina (ambas da Invitrogen, Karlsruhe, Alemanha) e 2,5 µg/ml de fungizona (Cambrex, EUA).

Para um experimento uma única aorta foi transferida para uma placa de cultura celular junto com o meio e foi removido tecido conjuntivo residual. Em seguida a aorta foi cortada com um bisturi em anéis de cerca de 1 a 2 mm de extensão. Os anéis foram lavados intensivamente (no mínimo cinco vezes) em meio Medium 199 (Invitrogen, Karlsruhe, Alemanha) e em seguida colocados dentro de cavidades de uma lâmina de 24 cavidades, contendo 450 µl de solução de colágeno por cavidade. Esta solução de colágeno foi preparada misturando 9 ml de colágeno da cauda de rato (3 mg/ml em 0,1% de ácido acético; Sigma, Deisenhofen, Alemanha) com 1,12 ml de 10X Medium 199 (Invitrogen, Karlsruhe, Alemanha), 1,12 ml de 10X tampão de Colágeno (0,05 N de NaOH, 200 mM de HEPES, 260 mM de NaHCO₃) e 0,6 ml de Glutamina a 200 mM. Os anéis foram orientados de tal modo que as bordas equilibradas ficassem perpendiculares ao fundo da cavidade. O colágeno foi deixado para solidificar incubando as lâminas por no mínimo uma hora a 37°C. Depois disso 1 ml de meio MCDB131 com adições (SDF-1 e Spiegelmeros) foi acrescentado por cavidade. Em seguida os anéis foram incubados a 37°C por seis a sete dias. Como controle para germinação os experimentos foram feitos adicionalmente com VEGF (Fator de crescimento endotelial vascular).

A germinação foi documentada tirando fotografias com uma câmera digital. Em alguns casos anéis foram fixados por adição de 1 ml de paraformaldeído a 10% e armazenados em 2 a 8°C para documentação posterior. As fotos foram analisadas com o software de processamento de imagens Scion Image. Depois de calibração com o auxílio de uma foto tirada de um micrômetro de estágio, uma linha foi desenhada em uma distância de 0,33 mm de uma borda de um anel. Um gráfico de histograma ao longo des-

ta linha foi gerada pelo software, histogramas foram impressos e picos (representando germinações cruzando a linha) foram contados. Este número foi tomado como índice de germinação. Foram avaliados 4 a 5 anéis por condição. Foi realizada análise estatística com WinSTAT for Excel.

5 **Resultados**

Pode ser demonstrado que SDF-1 induz germinação e que este efeito pode ser bloqueado com Spiegelmero 193-G2-012-5'-PEG de ligação de SDF-1 humano. Não foi observado bloqueio de germinação induzida por SDF-1 pelo Spiegelmero Controle PEGuilado não-funcional (Figs. 31 e 32).

10 **Exemplo 10: Nível plasmático de SDF-1 e Spiegelmero 193-G2-012-5'-PEG de ligação de SDF-1 humano administrado a ratos como bolo intravenoso único de Spiegelmero 193-G2-012-5'-PEG de ligação de SDF-1 humano**

Para testar se o Spiegelmero de ligação de SDF-1 humano 193-G2-012-5'-PEG é funcional *in vivo*, Spiegelmero de ligação de SDF-1 humano 193-G2-012-5'-PEG foi administrado em ratos como um bolo intravenoso e o nível plasmático de Spiegelmero de ligação de SDF-1 humano 193-G2-012-5'-PEG e de SDF-1 foram determinados. Como controle foram determinados os níveis plasmáticos de SDF-1 de ratos não tratados.

20 **Animais, administração e coleta de amostra**

Spiegelmero 193-G2-012-5'-PEG de ligação de SDF-1 humano foi dissolvido em PBS para uma concentração final de 0,5 mg/ml e filtrado estéril. Ratos machos Sprague Dawley (peso de aproximadamente 300 g) foram administrados com 1,0 mg/kg de Spiegelmero de ligação de SDF-1 humano 193-G2-012-5'-PEG como bolo intravenoso único. Amostras de sangue foram coletadas em vários pontos de tempo (conforme mostrado na Fig. 33) para seguir o clearance plasmático de Spiegelmero de ligação de SDF-1 humano 193-G2-012-5'-PEG.

Prova de hibridização de sanduíche para quantificação de Spiegelmero

30 A quantidade de Spiegelmero de ligação de SDF-1 humano 193-G2-012-5'-PEG nas amostras foi quantificada por uma prova de hibridização de sanduíche. O princípio da prova de hibridização de sanduíche é bastante

similiar a um ELISA comumente usado (Ensaio Imunossorvente ligado a Enzima): imobilização e detecção do Spiegelmero. A detecção se baseia na hibridização de uma sonda de detecção biotinilada a uma extremidade do Spiegelmero. A extremidade de filamento único remanescente da imobilização do meio de Spiegelmero do complexo na hibridização a uma sonda de captura imobilizada. Depois de complexos não ligados terem sido removidos, a sonda de detecção hibridizada ao Spiegelmero é finalmente detectada por um conjugado de estreptavidina / fosfatase alcalina convertendo um substrato de quimiluminescência. Uma prova de hibridização de sanduíche semelhante também foi aplicada para detecção e quantificação de um aptâmero de RNA conforme descrito por Drolet *et al.* (Drolet *et. al.*, 2000).

Preparação de lâmina de hibridização

A sonda de captura 193-G2-012 (Seq. ID.: 240) foi imobilizada para lâminas de 96 cavidades DNA-BIND brancas (Corning Costar, Wiesbaden, Alemanha) a 100 nM em 0,5 M de fosfato de sódio, 1 mM de EDTA, pH 8.5 de um dia para o outro a 4°C. As cavidades foram lavadas duas vezes e bloqueadas com 0,5% em peso/ vol de BSA em 0,25 M de fosfato de sódio, 0,5 mM de EDTA, pH 8.5 por 2 h a 25°C, lavadas de novo e armazenadas em temperatura ambiente até o uso. Antes de hibridização, lavadas duas vezes com tampão de lavagem (3×SSC, 0,5% [em peso/ vol] dodecil sarcosinato de sódio, pH 7.0; previamente um estoque de 20x [3 M de NaCl, 0,3 M de Na₃Citrato] é preparado sem lauroil sarcosina de sódio e diluído desta maneira).

Preparação da amostra

Todas as amostras foram testadas em duplicatas. Amostras de plasma foram degeladas sobre gelo, turbilhonadas e centrifugadas brevemente em uma centrifuga de tabletop resfriada. Homogenados de tecido foram degelados em temperatura ambiente e centrifugados 5 min em velocidade máxima e temperatura ambiente. As amostras foram diluídas com tampão de hibridização (40 nM de sonda de detecção 193-G2-012 [Seq. ID. 241] em tampão de lavagem) em temperatura ambiente de acordo com o seguinte esquema:

1:10 10 µl de amostra + 90 µl de tampão de hibridização

1:100 20 µl 1:10 + 180 µl de tampão de hibridização

Todas as diluições das amostras foram testadas. Spiegelmero de ligação de SDF-1 humano 193-G2-012-5'-PEG padrão foi diluído serialmente para uma curva de calibração de 12 pontos transpondo a faixa de 0,001 a 40 nM. O padrão de calibração foi idêntico ao das amostras em estudo.

Hibridização e detecção

As amostras foram aquecidas por 5 min a 95°C e resfriadas até a temperatura ambiente. Complexos de Spiegelmero / sonda de detecção foram recozidos para sondas de captura imobilizadas por 45 min a 25°C a 500 rpm sobre um shaker. Spiegelmeros não ligados foram removidos lavando duas vezes com tampão de lavagem e 1× TBST (20 mM de Tris-Cl, 137 mM de NaCl, 0,1% de Tween 20, pH 7.5), respectivamente. Complexos hibridizados foram detectados por estreptavidina fosfatase alcalina diluída a 1:5000 em 1× TBST por 1 h a 25°C a 500 rpm sobre um shaker. Para remover conjugado não ligado, as cavidades foram lavadas de novo com 1× TBST. As cavidades foram finalmente preenchidas com 100 µl de substrato CSDP (Applied Biosystems, Darmstadt, Alemanha) e incubadas por 45 min a 25°C. A quimiluminescência foi medida em uma leitora de microlâmina FLU-Ostar Optima (BMG Labtechnologies, Offenburg, Alemanha).

Análise dos dados

Foram usadas as seguintes diluições das amostras testadas para análise quantitativa dos dados:

EDTA plasma de rato 1:100

Os dados obtidos do grupo de veículo (nenhum Spiegelmero foi administrado) foram subtraídos como sinal de fundo.

ELISA para quantificação de Spiegelmero

A quantidade de SDF-1 presente nas amostras de plasma foi quantificada com um ensaio imunossorvente ligado a enzima in vitro o qual emprega um anticorpo específico para SDF-1α humano revestido sobre uma lâmina de 96 cavidades (kit Human SDF-1α ELISA; RayBiotech, Norcross

GA, EUA). O teste foi realizado de acordo com as instruções do vendedor.

Resultados

Conforme mostrado na Fig. 33 o nível plasmático regular de SDF-1 em ratos não tratados está na faixa picomolar baixa (aproximadamente 50 pM). Em contraste o nível plasmático de ratos que foram tratados com Spiegelmero 193-G2-012-5'-PEG de ligação de SDF-1 humano parece diferente: Dentro das primeiras oito horas depois da administração de Spiegelmero 193-G2-012-5'-PEG de ligação de SDF-1 humano o nível plasmático de SDF-1 aumentou para aproximadamente 700 pM. Entre 12 e 72 horas o nível plasmático de SDF-1 diminuiu para aproximadamente 50 pM novamente. Este curso de tempo do nível plasmático de SDF-1 pode ser diretamente correlacionado com o nível plasmático do Spiegelmero 193-G2-012-5'-PEG de ligação de SDF-1 humano. Devido à eliminação renal do Spiegelmero 193-G2-012-5'-PEG de ligação de SDF-1 humano, o nível plasmático do Spiegelmero 193-G2-012-5'-PEG de ligação de SDF-1 humano diminuiu de aproximadamente 1100 nM para abaixo de 50 nM dentro de 72 horas. No entanto, o Spiegelmero 193-G2-012-5'-PEG de ligação de SDF-1 humano (MW approximately 54000 Da) não foi eliminado do corpo dentro de uma hora conforme pode ser visto para Spiegelmeros não-PEGuilados (aproximadamente 15000 Da) ou outras moléculas com uma massa molecular abaixo do limite de filtração do rim como SDF-1. O SDF-1 endógeno foi ligado por Spiegelmero 193-G2-012-5'-PEG de ligação de SDF-1 humano formando complexos de SDF-1- Spiegelmero por meio dos quais a eliminação e/ou degradação de SDF-1 foi retardado o que levou como consequência a níveis plasmáticos de SDF-1 elevados dentro das primeiras oito horas. Devido ao prosseguimento da eliminação de Spiegelmero 193-G2-012-5'-PEG de ligação de SDF-1 humano durante o tempo - por meio da qual a taxa de eliminação é muito mais lenta do que para moléculas muito menores como SDF-1 - o nível plasmático dos complexos formados por Spiegelmero 193-G2-012-5'-PEG de ligação de SDF-1 humano e SDF-1 diminuiu (Fig. 33).

Referências

Os dados bibliográficos completos dos documentos menciona-

dos aqui, neste requerimento de patente, caso não indicados ao contrário, são como se segue, por meio dos quais a revelação das referidas referências é incorporada aqui, a este requerimento de patente, por meio de referência.

- 5 Aiuti, A., I. J. Webb, et al. (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.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990),
10 Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* 215 (3): 403-10.
- 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.
- Ambati, J., A. Anand, et al. (2003). An animal model of age-
15 related macular degeneration in senescent Ccl-2- or Ccr-2-deficient mice. *Nat Med.* 9: 1390-7.
- Arya, S. K., C. C. Ginsberg, et al. (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.
- 20 Auerbach et al. (2003) Angiogenesis assays: a critical overview. *Clin.Chem.* 49: 32-40.
- Baggiolini, M. (1998). "Chemokines and leukocyte traffic." *Nature* 392 (6676): 565-8.
- Baggiolini, M., B. Dewald, et al. (1994). "Interleukin-8 and related
25 chemotactic cytokines--CXC and CC chemokines." *Adv Immunol* 55: 97-179.
- Balabanian, K., B. Lagane, et al. (2005). "WHIM syndromes with different genetic anomalies are accounted for by impaired CXCR4 desensitization to CXCL12." *Blood* 105 (6): 2449-57.
- Balabanian, K., J. Couderc, et al. (2003). "Role of the chemokine
30 stromal cell-derived factor 1 in autoantibody production and nephritis in murine lupus." *J Immunol* 170 (6): 3392-400.
- Balkwill, F. (2004). "Cancer and the chemokine network." *Nat*

Rev Cancer 4 (7): 540-50.

Bazan, J. F., K. B. Bacon, et al. (1997). "A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif." *Nature* 385 (6617): 640-4.

5 Bertolini, F., C. Dell'Agnola, et al. (2002). "CXCR4 neutralization, a novel therapeutic approach for non-Hodgkin's lymphoma." *Cancer Res* 62 (11): 3106-12.

Bleul, C. C., J. L. Schultze, et al. (1998). "B lymphocyte chemotaxis regulated in association with microanatomic localization, differentiation state, and B cell receptor engagement." *J Exp Med* 187 (5): 753-62.

10 Bleul, C. C., M. Farzan, et al. (1996). "The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry." *Nature* 382 (6594): 829-33.

Brooks, H. L., Jr., S. Caballero, Jr., et al. (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.

Buckley, C. D., N. Amft, et al. (2000). "Persistent induction of the chemokine receptor CXCR4 by TGF-beta 1 on synovial T cells contributes to their accumulation within the rheumatoid synovium." *J Immunol* 165 (6): 20 3423-9.

Burger, J. A., N. Tsukada, et al. (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.

Butler, J. M., S. M. Guthrie, et al. (2005). "SDF-1 is both necessary and sufficient to promote proliferative retinopathy." *J Clin Invest* 115 (1): 25 86-93.

Cabioglu, N., A. Sahin, et al. (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.

30 Corcione, A., L. Ottonello, et al. (2000). "Stromal cell-derived factor-1 as a chemoattractant for follicular center lymphoma B cells." *J Natl Cancer Inst* 92 (8): 628-35.

Crump, M. P., J. H. Gong, et al. (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.

- 5 D'Apuzzo, M., A. Rolink, et al. (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.

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

- Drolet DW, Nelson J, Tucker CE, Zack PM, Nixon K, Bolin R, Judkins MB, Farmer JA, Wolf JL, Gill SC, Bendele RA (2000). Pharmacokinetics and safety of an anti-vascular endothelial growth factor aptamer (NX1838) following injection into the vitreous humor of rhesus monkeys.
- 15 *Pharm. Res.* 17: 1503

Eaton, B. E., L. Gold, et al. (1997). "Post-SELEX combinatorial optimization of aptamers." *Bioorg Med Chem* 5 (6): 1087-96.

- Fedyk, E. R., D. Jones, et al. (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.

Fong, D. S., L. P. Aiello, et al. (2004). "Diabetic retinopathy." *Diabetes Care* 27 (10): 2540-53.

- Geminder, H., O. Sagi-Assif, et al. (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.

Godessart, N. (2005). "Chemokine receptors: attractive targets for drug discovery." *Ann N Y Acad Sci* 1051: 647-57.

- Grassi, F., S. Cristino, et al. (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.
- 30

Grunewald, M., I. Avraham, et al. (2006). "VEGF-induced adult neovascularization: recruitment, retention, and role of accessory cells." *Cell* 124 (1): 175-89.

5 Guleng, B., K. Tateishi, et al. (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.

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

Hartmann, T. N., M. Burger, et al. (2004). "The role of adhesion molecules and chemokine receptor CXCR4 (CD184) in small cell lung cancer." *J Biol Regul Homeost Agents* 18 (2): 126-30.

15 Hwang, J. H., H. K. Chung, et al. (2003). "CXC chemokine receptor 4 expression and function in human anaplastic thyroid cancer cells." *J Clin Endocrinol Metab* 88 (1): 408-16.

Jiang, W., P. Zhou, et al. (1994). "Molecular cloning of TPAR1, a gene whose expression is repressed by the tumor promoter 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate (TPA)." *Exp Cell Res* 215 (2): 284-93.

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

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

25 Kanbe, K., K. Takagishi, et al. (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.

30 Kang, H., G. Watkins, et al. (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.

Kawai, T., U. Choi, et al. (2005). "Enhanced function with decreased internalization of carboxy-terminus truncated CXCR4 responsible for WHIM syndrome." *Exp Hematol* 33 (4): 460-8.

5 Koshiba, T., R. Hosotani, et al. (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.

Krumbholz, M., D. Theil, et al. (2006). "Chemokines in multiple sclerosis: CXCL12 and CXCL13 up-regulation is differentially linked to CNS immune cell recruitment." *Brain* 129: 200-211.

10 Kryczek, I., A. Lange, et al. (2005). "CXCL12 and vascular endothelial growth factor synergistically induce neoangiogenesis in human ovarian cancers." *Cancer Res* 65 (2): 465-72.

Kucia, M., R. Reca, et al. (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.

Kusser, W. (2000). "Chemically modified nucleic acid aptamers for in vitro selections: evolving evolution." *J Biotechnol* 74 (1): 27-38.

Lapteva, N., A. G. Yang, et al. (2005). "CXCR4 knockdown by small interfering RNA abrogates breast tumor growth in vivo." *Cancer Gene Ther* 12 (1): 84-9.

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

25 Ma, Q., D. Jones, et al. (1998). "Impaired B-lymphopoiesis, myelopoiesis, and derailed cerebellar neuron migration in CXCR4- and SDF-1-deficient mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (16): 9448-53.

Marechal, V., F. Arenzana-Seisdedos, et al. (1999). "Opposite effects of SDF-1 on human immunodeficiency virus type 1 replication." *J Virol* 73 (5): 3608-15.

30 Matthys, P., S. Hatse, et al. (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.

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.

5 Meleth, A. D., E. Agron, et al. (2005). "Serum inflammatory markers in diabetic retinopathy." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46 (11): 4295-301.

Menu, E., K. Asosingh, et al. (2006). "The involvement of stromal derived factor 1alpha in homing and progression of multiple myeloma in the 5TMM model." *Haematologica*.

10 Miller, M. D. and M. S. Krangel (1992). "Biology and biochemistry of the chemokines: a family of chemotactic and inflammatory cytokines." *Crit Rev Immunol* 12 (1-2): 17-46.

Moser, B., M. Wolf, et al. (2004). "Chemokines: multiple levels of leukocyte migration control." *Trends Immunol* 25 (2): 75-84.

15 Muller, A., B. Homey, et al. (2001). "Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis." *Nature* 410 (6824): 50-6.

Murdoch, C. (2000). "CXCR4: chemokine receptor extraordinaire." *Immunol Rev* 177: 175-84.

20 Murphy, P. M., M. Baggiolini, et al. (2000). "International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors." *Pharmacol Rev* 52 (1): 145-76.

Nagasawa, T., H. Kikutani, et al. (1994). "Molecular cloning and structure of a pre-B-cell growth-stimulating factor." *Proc Natl Acad Sci U S A* 91 (6): 2305-9.

25 Nagasawa, T., S. Hirota, et al. (1996). "Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1." *Nature* 382 (6592): 635-8.

30 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.

Oppenheim, J. J., C. O. Zachariae, et al. (1991). "Properties of the novel proinflammatory supergene "intercrine" cytokine family." *Annu Rev*

Immunol 9: 617-48.

Orimo, A., P. B. Gupta, et al. (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.

5 Pearson & Lipman (1988), Improved tools for biological sequence comparison. *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85: 2444

Perissinotto, E., G. Cavalloni, et al. (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.

10 Phillips, R. J., M. D. Burdick, et al. (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.

Ponath, P. D., S. Qin, et al. (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.

Rubin, J. B., A. L. Kung, et al. (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.

20 Salcedo et al. (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-1a. *Am. J. Pathol.* 154: 1125-1135.

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.

Salcedo, R., K. Wasserman, et al. (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-1alpha." *Am J Pathol* 154 (4): 1125-35.

30 Salvucci, O., L. Yao, et al. (2002). "Regulation of endothelial cell branching morphogenesis by endogenous chemokine stromal-derived factor-

1." Blood 99 (8): 2703-11.

Saur, D., B. Seidler, et al. (2005). "CXCR4 expression increases liver and lung metastasis in a mouse model of pancreatic cancer." *Gastroenterology* 129 (4): 1237-50.

5 Schall, T. J. and K. B. Bacon (1994). "Chemokines, leukocyte trafficking, and inflammation." *Curr Opin Immunol* 6 (6): 865-73.

Scotton, C. J., J. L. Wilson, et al. (2002). "Multiple actions of the chemokine CXCL12 on epithelial tumor cells in human ovarian cancer." *Cancer Res* 62 (20): 5930-8.

10 Sengupta, N., S. Caballero, et al. (2005). "Preventing stem cell incorporation into choroidal neovascularization by targeting homing and attachment factors." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46 (1): 343-8.

Shirozu, M., T. Nakano, et al. (1995). "Structure and chromosomal localization of the human stromal cell-derived factor 1 (SDF1) gene." *Genomics* 28 (3): 495-500.

Smith & Waterman (1981), *Adv. Appl. Math.* 2: 482

20 Soriano, A., C. Martinez, et al. (2002). "Plasma stromal cell-derived factor (SDF)-1 levels, SDF1-3'A genotype, and expression of CXCR4 on T lymphocytes: their impact on resistance to human immunodeficiency virus type 1 infection and its progression." *J Infect Dis* 186 (7): 922-31.

Springer, T. A. (1995). "Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration." *Annu Rev Physiol* 57: 827-72.

25 Sun, Y. X., A. Schneider, et al. (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.

30 Takenaga, M., H. Tamamura, et al. (2004). "A single treatment with microcapsules containing a CXCR4 antagonist suppresses pulmonary metastasis of murine melanoma." *Biochem Biophys Res Commun* 320 (1): 226-32.

Tamamura, H., M. Fujisawa, et al. (2004). "Identification of a

CXCR4 antagonist, a T140 analog, as an anti-rheumatoid arthritis agent." FEBS Lett 569 (1-3): 99-104.

5 Tashiro, K., H. Tada, et al. (1993). "Signal sequence trap: a cloning strategy for secreted proteins and type I membrane proteins." Science 261 (5121): 600-3.

Venkatesan, N., S. J. Kim, et al. (2003). "Novel phosphoramidite building blocks in synthesis and applications toward modified oligonucleotides." Curr Med Chem 10 (19): 1973-91.

10 Wang, J., E. Guan, et al. (2001). "Role of tyrosine phosphorylation in ligand-independent sequestration of CXCR4 in human primary monocytes-macrophages." J Biol Chem 276 (52): 49236-43.

Wang, N., Q. L. Wu, et al. (2005). "Expression of chemokine receptor CXCR4 in nasopharyngeal carcinoma: pattern of expression and correlation with clinical outcome." J Transl Med 3: 26.

15 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

20 Yamaguchi, J., K. F. Kusano, et al. (2003). "Stromal cell-derived factor-1 effects on ex vivo expanded endothelial progenitor cell recruitment for ischemic neovascularization." Circulation 107 (9): 1322-8.

Yasumoto, K., K. Koizumi, et al. (2006). "Role of the CXCL12/CXCR4 axis in peritoneal carcinomatosis of gastric cancer." Cancer Res 66 (4): 2181-7.

25 Zeelenberg, I. S., L. Ruuls-Van Stalle, et al. (2001). "Retention of CXCR4 in the endoplasmic reticulum blocks dissemination of a T cell hybridoma." J Clin Invest 108 (2): 269-77.

30 Zeelenberg, I. S., L. Ruuls-Van Stalle, et al. (2003). "The chemokine receptor CXCR4 is required for outgrowth of colon carcinoma micrometastases." Cancer Res 63 (13): 3833-9.

Zhou, Y., P. H. Larsen, et al. (2002). "CXCR4 is a major chemokine receptor on glioma cells and mediates their survival." J Biol Chem 277

(51): 49481-7.

Zou, Y. R., A. H. Kottmann, et al. (1998). "Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development." *Nature* 393 (6685): 595-9.

- 5 As características da presente invenção reveladas na especificação, suas reivindicações e/ou os desenhos podem tanto separadamente quanto em qualquer combinação dos mesmos ser material para realizar a invenção em várias formas da mesma.

Listagem de Sequências

<110> NOXXON Pharma AG
 <120> Ácidos nucleicos ligando a SDF-1
 <130> N10052 PCT
 5 <160> 241
 <170> PatentIn versão 3.1
 <210> 1
 <211> 68
 <212> PRT
 10 <213> Homo sapiens
 <400> 1
 Lys Pro Val Ser Leu Ser Tyr Arg Cys Pro Cys Arg Phe Phe Glu Ser
 1 5 10 15
 His Val Ala Arg Ala Asn Val Lys His Leu Lys Ile Leu Asn Thr Pro
 15 20 25 30
 Asn Cys Ala Leu Gln Ile Val Ala Arg Leu Lys Asn Asn Asn Arg Gln
 35 40 45
 Val Cys Ile Asp Pro Lys Leu Lys Trp Ile Gln Glu Tyr Leu Glu Lys
 50 55 60
 20 Ala Leu Asn Lys
 65
 <210> 2
 <211> 72
 <212> PRT
 25 <213> Homo sapiens
 <400> 2
 Lys Pro Val Ser Leu Ser Tyr Arg Cys Pro Cys Arg Phe Phe Glu Ser
 1 5 10 15
 His Val Ala Arg Ala Asn Val Lys His Leu Lys Ile Leu Asn Thr Pro
 30 20 25 30
 Asn Cys Ala Leu Gln Ile Val Ala Arg Leu Lys Asn Asn Asn Arg Gln
 35 40 45

Val Cys Ile Asp Pro Lys Leu Lys Trp Ile Gln Glu Tyr Leu Glu Lys
50 55 60

Ala Leu Asn Lys Arg Phe Lys Met
65 70

5 <210> 3
<211> 68
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 3

10 Lys Pro Val Ser Leu Ser Tyr Arg Cys Pro Cys Arg Phe Phe Glu Ser
1 5 10 15
His Ile Ala Arg Ala Asn Val Lys His Leu Lys Ile Leu Asn Thr Pro
20 25 30
Asn Cys Ala Leu Gln Ile Val Ala Arg Leu Lys Asn Asn Asn Arg Gln
15 35 40 45
Val Cys Ile Asp Pro Lys Leu Lys Trp Ile Gln Glu Tyr Leu Glu Lys
50 55 60

Ala Leu Asn Lys
65

20 <210> 4
<211> 71
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<220>

25 <221> misc_feature
<222> (1)..(71)
<223> D-peptideo
<220>

30 <221> misc_feature
<222> (71)..(71)
<223> biotinilada
<400> 4

Lys Pro Val Ser Leu Ser Tyr Arg Cys Pro Cys Arg Phe Phe Glu Ser
1 5 10 15
His Val Ala Arg Ala Asn Val Lys His Leu Lys Ile Leu Asn Thr Pro
20 25 30
5 Asn Cys Ala Leu Gln Ile Val Ala Arg Leu Lys Asn Asn Asn Arg Gln
35 40 45
Val Cys Ile Asp Pro Lys Leu Lys Trp Ile Gln Glu Tyr Leu Glu Lys
50 55 60
Ala Leu Asn Lys Arg Phe Lys
10 65 70
<210> 5
<211> 38
<212> RNA
<213> Sequência artificial
15 <220>
<223> sintética
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(38)
20 <223> L-RNA
<400> 5
gcugugaaag caacauguca augaaaggua gccgcagc
<210> 6
<211> 38
25 <212> RNA
<213> Sequência artificial
<220>
<223> sintética
<220>
30 <221> misc_feature
<222> (1)..(38)
<223> L-RNA

38

	<400> 6	
	gcugugaaag uaacauguca augaaaggua accacagc	38
	<210> 7	
	<211> 38	
5	<212> RNA	
	<213> Sequência artificial	
	<220>	
	<223> sintética	
	<220>	
10	<221> misc_feature	
	<222> (1)..(38)	
	<223> L-RNA	
	<400> 7	
	gcugugaaag uaacacguca augaaaggua accgcagc	38
15	<210> 8	
	<211> 38	
	<212> RNA	
	<213> Sequência artificial	
	<220>	
20	<223> sintética	
	<220>	
	<221> L-RNA	
	<222> (1)..(38)	
	<223>	
25	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (1)..(38)	
	<223> L-RNA	
	<400> 8	
30	gcugugaaag uaacacguca augaaaggua accacagc	38
	<210> 9	
	<211> 38	

```

    <212> RNA
    <213> Sequência artificial
    <220>
    <223> sintética
5  <220>
    <221> L-RNA
    <222> (1)..(38)
    <223>
    <220>
10 <221> misc_feature
    <222> (1)..(38)
    <223> L-RNA
    <400> 9
    gcuguaaaaag uaacauguca augaaaggua acuacagc 38
15 <210> 10
    <211> 38
    <212> RNA
    <213> Artificial
    <220>
20 <221> L-RNA
    <222> (1)..(38)
    <223>
    <220>
    <221> misc_feature
25 <222> (1)..(38)
    <223> L-RNA
    <400> 10
    gcuguaaaaag uaacaaguca augaaaggua acuacagc 38
    <210> 11
30 <211> 38
    <212> RNA
    <213> Sequência artificial

```

<220>
 <223> sintética
 <220>
 <221> L-RNA
 5 <222> (1)..(38)
 <223>
 <400> 11
 gcugugaaag uaacaaguca augaaaggua accacagc 38
 <210> 12
 10 <211> 38
 <212> RNA
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> sintética
 15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(38)
 <223> L-RNA
 <400> 12
 20 gcagugaaag uaacauguca augaaaggua accacagc 38
 <210> 13
 <211> 38
 <212> RNA
 <213> Sequência artificial
 25 <220>
 <223> sintética
 <220>
 <221> L-RNA
 <222> (1)..(38)
 30 <223>
 <400> 13
 gcugugaaag uaacauguca augaaaggua accacugc 38

<210> 14
 <211> 38
 <212> RNA
 <213> Sequência artificial
 5 <220>
 <223> sintética
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(38)
 10 <223> L-RNA
 <400> 14
 gcuaugaaag uaacauguca augaaaggua accauagc 38
 <210> 15
 <211> 38
 15 <212> RNA
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> sintética
 <220>
 20 <221> misc_feature
 <222> (1)..(38)
 <223> L-RNA
 <400> 15
 gcugcgaaaag cgacauguca augaaaggua gccgcagc 38
 25 <210> 16
 <211> 38
 <212> RNA
 <213> Sequência artificial
 <220>
 30 <223> sintética
 <220>
 <221> L-RNA

```

    <222> (1)..(38)
    <223>
    <220>
    <221> misc_feature
5  <222> (1)..(38)
    <223> L-RNA
    <400> 16
    gcugugaaag caacauguca augaaaggua gccacagc 38
    <210> 17
10 <211> 38
    <212> RNA
    <213> Sequência artificial
    <220>
    <223> sintética
15 <220>
    <221> misc_feature
    <222> (1)..(38)
    <223> L-RNA
    <400> 17
20 gcugugaaag uaacauguca augaaaggua gccgcagc 38
    <210> 18
    <211> 39
    <212> RNA
    <213> Sequência artificial
25 <220>
    <223> sintética
    <220>
    <221> misc_feature
    <222> (1)..(38)
30 <223> L-RNA
    <400> 18
    agcgugaaag uaacacguaa aaugaaaggu aaccacgcu 39

```

<210> 19
 <211> 27
 <212> RNA
 <213> Sequência artificial
 5 <220>
 <223> sintética
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(27)
 10 <223> L-RNA
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (16)..(16)
 <223> A ou ausente
 15 <400> 19
 aaagyracah gumaaaugaa agguarc 27
 <210> 20
 <211> 26
 <212> RNA
 20 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> sintética
 <220>
 <221> misc_feature
 25 <222> (1)..(26)
 <223> L-RNA
 <400> 20
 aaagyracah gumaaugaaa gguarc 26
 <210> 21
 30 <211> 27
 <212> RNA
 <213> Sequência artificial

```

    <220>
    <223>  sintética
    <220>
    <221>  misc_feature
5  <222>  (1)..(27)
    <223>  L-RNA
    <400>  21
    aaagyracah gumaaaugaa agguarc 27
    <210>  22
10 <211>  26
    <212>  RNA
    <213>  Sequência artificial
    <220>
    <223>  sintética
15 <220>
    <221>  misc_feature
    <222>  (1)..(26)
    <223>  L-RNA
    <400>  22
20 aaagyaacah gucaaugaaa gguarc 26
    <210>  23
    <211>  6
    <212>  RNA
    <213>  Sequência artificial
25 <220>
    <223>  sintética
    <220>
    <221>  misc_feature
    <222>  (1)..(6)
30 <223>  L-RNA
    <400>  23
    rshryr 6

```

	<210>	24	
	<211>	6	
	<212>	RNA	
	<213>	Sequência artificial	
5	<220>		
	<223>	sintética	
	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<222>	(1)..(6)	
10	<223>	L-RNA	
	<400>	24	
	yrydsy		6
	<210>	25	
	<211>	36	
15	<212>	RNA	
	<213>	Sequência artificial	
	<220>		
	<223>	sintética	
	<220>		
20	<221>	misc_feature	
	<222>	(1)..(36)	
	<223>	L-RNA	
	<400>	25	
	cugugaaagc aacaugucaa ugaaagguag ccgcag		36
25	<210>	26	
	<211>	34	
	<212>	RNA	
	<213>	Sequência artificial	
	<220>		
30	<223>	sintética	
	<220>		
	<221>	misc_feature	

	<222>	(1)..(34)	
	<223>	L-RNA	
	<400>	26	
		ugugaaagca acaugucaau gaaagguagc cgca	34
5	<210>	27	
	<211>	32	
	<212>	RNA	
	<213>	Sequência artificial	
	<220>		
10	<223>	sintética	
	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<222>	(1)..(32)	
	<223>	L-RNA	
15	<400>	27	
		gugaaagcaa caugucaaug aaagguagcc gc	32
	<210>	28	
	<211>	30	
	<212>	RNA	
20	<213>	Sequência artificial	
	<220>		
	<223>	sintética	
	<220>		
	<221>	misc_feature	
25	<222>	(1)..(30)	
	<223>	L-RNA	
	<400>	28	
		ugaaagcaac augucaauga aagguagccg	30
	<210>	29	
30	<211>	28	
	<212>	RNA	
	<213>	Sequência artificial	

<220>
 <223> sintética
 <220>
 <221> L-RNA
 5 <222> (1)..(28)
 <223>
 <400> 29
 gaaagcaaca ugucaaugaa agguagcc 28
 <210> 30
 10 <211> 26
 <212> RNA
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> sintética
 15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(26)
 <223> L-RNA
 <400> 30
 20 aaagcaacau gucaaugaaa gguagc 26
 <210> 31
 <211> 36
 <212> RNA
 <213> Sequência artificial
 25 <220>
 <223> sintética
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(36)
 30 <223> L-RNA
 <400> 31
 gcgugaaagc aacaugucua ugaaagguag ccgcgc 36

```

    <210> 32
    <211> 36
    <212> RNA
    <213> Sequência artificial
5  <220>
    <223> sintética
    <220>
    <221> misc_feature
    <222> (1)..(36)
10 <223> L-RNA
    <400> 32
    gcgcgaaagc aacaugucaa ugaaagguag ccgcgc 36
    <210> 33
    <211> 34
15 <212> RNA
    <213> Sequência artificial
    <220>
    <223> sintética
    <220>
20 <221> misc_feature
    <222> (1)..(34)
    <223> L-RNA
    <400> 33
    gcggaaagca acaugucaau gaaagguagc ccgc 34
25 <210> 34
    <211> 34
    <212> RNA
    <213> Sequência artificial
    <220>
30 <223> sintética
    <220>
    <221> misc_feature

```

<222> (1)..(34)
 <223> L-RNA
 <400> 34
 cgugaaagca acaugucaau gaaagguagc cgcg 34
 5 <210> 35
 <211> 34
 <212> RNA
 <213> Sequência artificial
 <220>
 10 <223> sintética
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(34)
 <223> L-RNA
 15 <400> 35
 gcgcaaagca acaugucaau gaaagguagc gugc 34
 <210> 36
 <211> 34
 <212> RNA
 20 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> sintética
 <220>
 <221> misc_feature
 25 <222> (1)..(34)
 <223> L-RNA
 <400> 36
 gugcaaagca acaugucaau gaaagguagc gcgc 34
 <210> 37
 30 <211> 34
 <212> RNA
 <213> Sequência artificial

```

    <220>
    <223>  sintética
    <220>
    <221>  misc_feature
5  <222>  (1)..(34)
    <223>  L-RNA
    <400>  37
    cgcgaaagca acaugucaau gaaagguagc cgug
    <210>  38
10 <211>  34
    <212>  RNA
    <213>  Sequência artificial
    <220>
    <223>  sintética
15 <220>
    <221>  misc_feature
    <222>  (1)..(34)
    <223>  L-RNA
    <400>  38
20 gggcaaagca acaugucaau gaaagguagc gccc
    <210>  39
    <211>  34
    <212>  RNA
    <213>  Sequência artificial
25 <220>
    <223>  sintética
    <220>
    <221>  misc_feature
    <222>  (1)..(34)
30 <223>  L-RNA
    <400>  39
    ggccaaagca acaugucaau gaaagguagc ggcc

```

34

34

34

```

<210> 40
<211> 34
<212> RNA
<213> Sequência artificial
5 <220>
<223> sintética
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(34)
10 <223> L-RNA
<400> 40
gcccaaagca acaugucaau gaaagguagc gggc 34
<210> 41
<211> 34
15 <212> RNA
<213> Sequência artificial
<220>
<223> sintética
<220>
20 <221> misc_feature
<222> (1)..(34)
<223> L-RNA
<400> 41
cccaaagca acaugucaau gaaagguagc gggg 34
25 <210> 42
<211> 5
<212> RNA
<213> Sequência artificial
<220>
30 <223> sintética
<220>
<221> misc_feature

```

	<222>	(1)..(5)	
	<223>	L-RNA	
	<220>		
	<221>	misc_feature	
5	<222>	(1)..(1)	
	<223>	s ou ausente	
	<400>	42	
	sbbbs		5
	<210>	43	
10	<211>	5	
	<212>	RNA	
	<213>	Sequência artificial	
	<220>		
	<223>	sintética	
15	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<222>	(1)..(5)	
	<223>	L-RNA	
	<220>		
20	<221>	misc_feature	
	<222>	(5)..(5)	
	<223>	s ou ausente	
	<400>	43	
	sbbvs		5
25	<210>	44	
	<211>	6	
	<212>	RNA	
	<213>	Sequência artificial	
	<220>		
30	<223>	sintética	
	<220>		
	<221>	misc_feature	

```

    <222> (3)..(3)
    <223> nucleotídeo = a, g, c ou u
    <220>

    <221> misc_feature
5    <222> (4)..(4)
    <223> nucleotídeo = a, g, c ou u
    <220>

    <221> misc_feature
    <222> (1)..(6)
10   <223> L-RNA
    <220>

    <221> misc_feature
    <222> (1)..(1)
    <223> R ou ausente
15   <220>

    <221> misc_feature
    <222> (2)..(2)
    <223> s ou ausente
    <400> 44
20   rsnnbv
    <210> 45
    <211> 6
    <212> RNA
    <213> Sequência artificial
25   <220>

    <223> sintética
    <220>

    <221> misc_feature
    <222> (1)..(6)
30   <223> L-RNA
    <220>

    <221> misc_feature

```

	<222>	(2)..(2)	
	<223>	nucleotídeo = a, g, c ou u	
	<220>		
	<221>	misc_feature	
5	<222>	(4)..(4)	
	<223>	nucleotídeo = a, g, c ou u	
	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<222>	(5)..(5)	
10	<223>	R ou ausente	
	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<222>	(6)..(6)	
	<223>	y ou ausente	
15	<400>	45	
		bnbnry	6
	<210>	46	
	<211>	47	
	<212>	RNA	
20	<213>	Sequência artificial	
	<220>		
	<223>	sintética	
	<220>		
	<221>	misc_feature	
25	<222>	(1)..(47)	
	<223>	L-RNA	
	<400>	46	
		agcguggugu gaucuagaug uaguggcuga uccuagucag guacgcu	47
	<210>	47	
30	<211>	47	
	<212>	RNA	
	<213>	Sequência artificial	

<220>
 <223> sintética
 <220>
 <221> misc_feature
 5 <222> (1)..(47)
 <223> L-RNA
 <400> 47
 agcguggugu gaucuagaug uauuggcuga uccuagucag guacgcu 47
 <210> 48
 10 <211> 47
 <212> RNA
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> sintética
 15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(47)
 <223> L-RNA
 <400> 48
 20 agcguggugu gaucuagaug uauuggcuga uccuagucag gugcgcu 47
 <210> 49
 <211> 45
 <212> RNA
 <213> Sequência artificial
 25 <220>
 <223> sintética
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(45)
 30 <223> L-RNA
 <400> 49
 gcgaggugug aucuagaugu aguggcugau ccuagucagg uacgc 45

<210> 50
 <211> 45
 <212> RNA
 <213> Sequência artificial
 5 <220>
 <223> sintética
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(45)
 10 <223> L-RNA
 <400> 50
 gcguggugug aucuagaugu aguggcugau ccuagucagg ugccg 45
 <210> 51
 <211> 45
 15 <212> RNA
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> sintética
 <220>
 20 <221> misc_feature
 <222> (1)..(45)
 <223> L-RNA
 <400> 51
 gcauggugug aucuagaugu aguggcugau ccuagucagg ugccc 45
 25 <210> 52
 <211> 45
 <212> RNA
 <213> Sequência artificial
 <220>
 30 <223> sintética
 <220>
 <221> misc_feature

<222> (1)..(45)
 <223> L-RNA
 <400> 52
 gcguggugug aucuagaugu aaaggcugau ccuagucagg gacgc 45
 5 <210> 53
 <211> 45
 <212> RNA
 <213> Sequência artificial
 <220>
 10 <223> sintética
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(45)
 <223> L-RNA
 15 <400> 53
 gcguggugug aucuagaugu agaggcugau ccuagucagg uacgc 45
 <210> 54
 <211> 45
 <212> RNA
 20 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> sintética
 <220>
 <221> misc_feature
 25 <222> (1)..(45)
 <223> L-RNA
 <400> 54
 gcguggugug aucuagaugu aaaggcugau ccuagucagg uacgc 45
 <210> 55
 30 <211> 45
 <212> RNA
 <213> Sequência artificial

```

    <220>
    <223>  sintética
    <220>
    <221>  L-RNA
5    <222>  (1)..(45)
    <223>
    <220>
    <221>  misc_feature
    <222>  (1)..(45)
10   <223>  L-RNA
    <400>  55
      gcguggugug aucuagaugu aguggcuguu ccuagucagg uaugc
                                         45
    <210>  56
    <211>  45
15   <212>  RNA
    <213>  Sequência artificial
    <220>
    <223>  sintética
    <220>
20   <221>  misc_feature
    <222>  (1)..(45)
    <223>  L-RNA
    <400>  56
      gcguggugug aucuagaugu aguggcugau ccuaguuagg uacgc
                                         45
25   <210>  57
    <211>  35
    <212>  RNA
    <213>  Sequência artificial
    <220>
30   <223>  sintética
    <220>
    <221>  misc_feature

```

<222> (1)..(35)
 <223> L-RNA
 <400> 57
 gugugaucua gauguadwgg cugwuccuag uyagg 35
 5 <210> 58
 <211> 35
 <212> RNA
 <213> Sequência artificial
 <220>
 10 <223> sintética
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(35)
 <223> L-RNA
 15 <400> 58
 gugugaucua gauguadugg cugauccuag ucagg 35
 <210> 59
 <211> 6
 <212> RNA
 20 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> sintética
 <220>
 <221> misc_feature
 25 <222> (1)..(6)
 <223> L-RNA
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 30 <223> A ou ausente
 <400> 59
 agcrwg 6

```

    <210> 60
    <211> 6
    <212> RNA
    <213> Sequência artificial
5  <220>
    <223> sintética
    <220>
    <221> misc_feature
    <222> (1)..(6)
10 <223> L-RNA
    <220>
    <221> misc_feature
    <222> (6)..(6)
    <223> U ou ausente
15 <400> 60
    kryscu
    <210> 61
    <211> 45
    <212> RNA
20 <213> Sequência artificial
    <220>
    <223> sintética
    <220>
    <221> misc_feature
25 <222> (1)..(45)
    <223> L-RNA
    <400> 61
    gcguggugug aucuagaugu aguggcugau ccuagucagg uacgc
    <210> 62
30 <211> 43
    <212> RNA
    <213> Sequência artificial

```

6

45

```

    <220>
    <223>  sintética
    <220>
    <221>  misc_feature
5  <222>  (1)..(43)
    <223>  L-RNA
    <400>  62
    cgugguguga ucuagaugua guggcugauc cuagucaggu acg
    <210>  63
10 <211>  41
    <212>  RNA
    <213>  Sequência artificial
    <220>
    <223>  sintética
15 <220>
    <221>  misc_feature
    <222>  (1)..(41)
    <223>  L-RNA
    <400>  63
20 guggugugau cuagauguag uggcugaucc uagucaggua c
    <210>  64
    <211>  39
    <212>  RNA
    <213>  Sequência artificial
25 <220>
    <223>  sintética
    <220>
    <221>  L-RNA
    <222>  (1)..(39)
30 <223>
    <220>
    <221>  misc_feature

```

	<222>	(1)..(39)	
	<223>	L-RNA	
	<400>	64	
		uggugugauc uagauguagu ggcugauccu agucaggua	39
5	<210>	65	
	<211>	37	
	<212>	RNA	
	<213>	Sequência artificial	
	<220>		
10	<223>	sintética	
	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<222>	(1)..(37)	
	<223>	L-RNA	
15	<400>	65	
		ggugugaucu agauguagug gcugauccua gucaggu	37
	<210>	66	
	<211>	35	
	<212>	RNA	
20	<213>	Sequência artificial	
	<220>		
	<223>	sintética	
	<220>		
	<221>	misc_feature	
25	<222>	(1)..(35)	
	<223>	L-RNA	
	<400>	66	
		gugugaucua gauguagugg cugauccuag ucagg	35
	<210>	67	
30	<211>	45	
	<212>	RNA	
	<213>	Sequência artificial	

<220>
 <223> sintética
 <220>
 <221> misc_feature
 5 <222> (1)..(45)
 <223> L-RNA
 <400> 67
 gcguggugug aucuagaugu auuggcugau ccuagucagg uacgc 45
 <210> 68
 10 <211> 45
 <212> RNA
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> sintética
 15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(45)
 <223> L-RNA
 <400> 68
 20 gcgcggugug aucuagaugu auuggcugau ccuagucagg cgcgc 45
 <210> 69
 <211> 43
 <212> RNA
 <213> Sequência artificial
 25 <220>
 <223> sintética
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(43)
 30 <223> L-RNA
 <400> 69
 gcgcguguga ucuagaugua uggcugauc cuagucaggg cgc 43

<210> 70
 <211> 43
 <212> RNA
 <213> Sequência artificial
 5 <220>
 <223> sintética
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(43)
 10 <223> L-RNA
 <400> 70
 gggcguguga ucuagaugua uggcugauc cuagucaggg ccc 43
 <210> 71
 <211> 43
 15 <212> RNA
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> sintética
 <220>
 20 <221> misc_feature
 <222> (1)..(43)
 <223> L-RNA
 <400> 71
 ggccguguga ucuagaugua uggcugauc cuagucaggg gcc 43
 25 <210> 72
 <211> 43
 <212> RNA
 <213> Sequência artificial
 <220>
 30 <223> sintética
 <220>
 <221> misc_feature

```

    <222> (1)..(43)
    <223> L-RNA
    <400> 72
    gcccguguga ucuagaugua uggcugauc cuagucaggg ggc
5    <210> 73
    <211> 5
    <212> RNA
    <213> Sequência artificial
    <220>
10   <223> sintética
    <220>
    <221> misc_feature
    <222> (1)..(5)
    <223> L-RNA
15   <220>
    <221> misc_feature
    <222> (1)..(1)
    <223> G ou ausente
    <400> 73
20   gssbs
    <210> 74
    <211> 5
    <212> RNA
    <213> Sequência artificial
25   <220>
    <223> sintética
    <220>
    <221> misc_feature
    <222> (1)..(5)
30   <223> L-RNA
    <220>
    <221> misc_feature

```

43

5

	<222>	(5)..(5)	
	<223>	C ou ausente	
	<400>	74	
	bvssc		5
5	<210>	75	
	<211>	6	
	<212>	RNA	
	<213>	Sequência artificial	
	<220>		
10	<223>	sintética	
	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<222>	(1)..(6)	
	<223>	L-RNA	
15	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<222>	(1)..(1)	
	<223>	A ou ausente	
	<400>	75	
20	agcgug		6
	<210>	76	
	<211>	6	
	<212>	RNA	
	<213>	Sequência artificial	
25	<220>		
	<223>	sintética	
	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<222>	(1)..(6)	
30	<223>	L-RNA	
	<220>		
	<221>	misc_feature	

	<222>	(6)..(6)	
	<223>	U ou ausente	
	<400>	76	
	uacgcu		6
5	<210>	77	
	<211>	6	
	<212>	RNA	
	<213>	Sequência artificial	
	<220>		
10	<223>	sintética	
	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<222>	(1)..(6)	
	<223>	L-RNA	
15	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<222>	(1)..(1)	
	<223>	A ou ausente	
	<220>		
20	<221>	misc_feature	
	<222>	(2)..(2)	
	<223>	G ou ausente	
	<220>		
	<221>	misc_feature	
25	<222>	(5)..(5)	
	<223>	nucleotídeo = a, g, c ou u	
	<400>	77	
	agsvns		6
	<210>	78	
30	<211>	6	
	<212>	RNA	
	<213>	Sequência artificial	

	<220>	
	<223> sintética	
	<220>	
	<221> misc_feature	
5	<222> (1)..(6)	
	<223> L-RNA	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (5)..(5)	
10	<223> C ou ausente	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (6)..(6)	
	<223> U ou ausente	
15	<400> 78	
	bvbscu	6
	<210> 79	
	<211> 39	
	<212> RNA	
20	<213> Sequência artificial	
	<220>	
	<223> sintética	
	<220>	
	<221> misc_feature	
25	<222> (1)..(39)	
	<223> L-RNA	
	<400> 79	
	gugcugcggg gguuagggcu agaagucggc cugcagcac	39
	<210> 80	
30	<211> 39	
	<212> RNA	
	<213> Sequência artificial	

<220>
 <223> sintética
 <220>
 <221> misc_feature
 5 <222> (1)..(39)
 <223> L-RNA
 <400> 80
 agcguggcga gguuagggcu agaagucggu cgacacgcu 39
 <210> 81
 10 <211> 39
 <212> RNA
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> sintética
 15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(39)
 <223> L-RNA
 <400> 81
 20 guguugcgga gguuagggcu agaagucggu cagcagcac 39
 <210> 82
 <211> 48
 <212> RNA
 <213> Sequência artificial
 25 <220>
 <223> sintética
 <220>
 <221> L-RNA
 <222> (1)..(48)
 30 <223>
 <400> 82
 cgugcgcuug agauaggggu uagggcuuaa agucggcuca uucucacg 48

<210> 83
 <211> 39
 <212> RNA
 <213> Sequência artificial
 5 <220>
 <223> sintética
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(39)
 10 <223> L-RNA
 <400> 83
 agcgugaagg gguuagggcu cgaagucggc ugacacgcu 39
 <210> 84
 <211> 39
 15 <212> RNA
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> sintética
 <220>
 20 <221> L-RNA
 <222> (1)..(39)
 <223>
 <400> 84
 gugcugcggg gguuagggcu cgaagucggc ccgcagcac 39
 25 <210> 85
 <211> 39
 <212> RNA
 <213> Sequência artificial
 <220>
 30 <223> sintética
 <220>
 <221> misc_feature

<222> (1)..(39)
 <223> L-RNA
 <400> 85
 guguucccg gguuagggcu ugaagucggc cggcagcac 39
 5 <210> 86
 <211> 39
 <212> RNA
 <213> Sequência artificial
 <220>
 10 <223> sintética
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(39)
 <223> L-RNA
 15 <400> 86
 guguugcagg gguuagggcu ugaagucggc cugcagcac 39
 <210> 87
 <211> 39
 <212> RNA
 20 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> sintética
 <220>
 <221> misc_feature
 25 <222> (1)..(39)
 <223> L-RNA
 <400> 87
 gugcugcggg gguuagggcu caaagucggc cugcagcac 39
 <210> 88
 30 <211> 38
 <212> RNA
 <213> Sequência artificial

```

    <220>
    <223>  sintética
    <220>
    <221>  misc_feature
5  <222>  (1)..(38)
    <223>  L-RNA
    <400>  88
    gugcugccgg gguuagggcu aaagucggcc gacagcac
    <210>  89
10 <211>  39
    <212>  RNA
    <213>  Sequência artificial
    <220>
    <223>  sintética
15 <220>
    <221>  misc_feature
    <222>  (1)..(39)
    <223>  L-RNA
    <400>  89
20 gugcuguggg ggucagggcu agaagucggc cugcagcac
    <210>  90
    <211>  19
    <212>  RNA
    <213>  Sequência artificial
25 <220>
    <223>  sintética
    <220>
    <221>  misc_feature
    <222>  (1)..(19)
30 <223>  L-RNA
    <220>
    <221>  misc_feature

```

	<222> (13)..(13)	
	<223> A ou ausente	
	<220>	
	<221> misc_feature	
5	<222> (13)..(13)	
	<223> A ou ausente	
	<400> 90	
	gguyagggcu hraagucgg	19
	<210> 91	
10	<211> 19	
	<212> RNA	
	<213> Sequência artificial	
	<220>	
	<223> sintética	
15	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (1)..(19)	
	<223> L-RNA	
	<400> 91	
20	gguyagggcu hraagucgg	19
	<210> 92	
	<211> 18	
	<212> RNA	
	<213> Sequência artificial	
25	<220>	
	<223> sintética	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (1)..(18)	
30	<223> L-RNA	
	<400> 92	
	gguyagggcu hragucgg	18

<210> 93
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Sequência artificial
 5 <220>
 <223> sintética
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(19)
 10 <223> L-RNA
 <400> 93
 gguuagggcu hgaagucgg 19
 <210> 94
 <211> 38
 15 <212> RNA
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> sintética
 <220>
 20 <221> misc_feature
 <222> (1)..(38)
 <223> L-RNA
 <400> 94
 ugagauaggg guuagggcu aaagucggcu gauucuca 38
 25 <210> 95
 <211> 36
 <212> RNA
 <213> Sequência artificial
 <220>
 30 <223> sintética
 <220>
 <221> misc_feature

	<222>	(1)..(36)	
	<223>	L-RNA	
	<400>	95	
		gagauagggg uuagggcuua aagucggcug auucuc	36
5	<210>	96	
	<211>	29	
	<212>	RNA	
	<213>	Sequência artificial	
	<220>		
10	<223>	sintética	
	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<222>	(1)..(29)	
	<223>	L-RNA	
15	<400>	96	
		gggguuaggg cuuaaagucg gcugauucu	29
	<210>	97	
	<211>	37	
	<212>	RNA	
20	<213>	Sequência artificial	
	<220>		
	<223>	sintética	
	<220>		
	<221>	misc_feature	
25	<222>	(1)..(37)	
	<223>	L-RNA	
	<400>	97	
		gcguggcgag guuagggcua gaagucgguc gacacgc	37
	<210>	98	
30	<211>	35	
	<212>	RNA	
	<213>	Sequência artificial	

<220>
 <223> sintética
 <220>
 <221> misc_feature
 5 <222> (1)..(35)
 <223> L-RNA
 <400> 98
 cguggcgagg uuagggcuag aagucggucg acacg 35
 <210> 99
 10 <211> 33
 <212> RNA
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> sintética
 15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(33)
 <223> L-RNA
 <400> 99
 20 cgggcgaggu uagggcuaga agucggucga ccg 33
 <210> 100
 <211> 32
 <212> RNA
 <213> Sequência artificial
 25 <220>
 <223> sintética
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(32)
 30 <223> L-RNA
 <400> 100
 gggcgagguu agggcuagaa gucggucgcc cg 32

<210> 101
 <211> 31
 <212> RNA
 <213> Sequência artificial
 5 <220>
 <223> sintética
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(31)
 10 <223> L-RNA
 <400> 101
 cggcgagguu agggcuagaa gucggucgcc g 31
 <210> 102
 <211> 29
 15 <212> RNA
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> sintética
 <220>
 20 <221> misc_feature
 <222> (1)..(29)
 <223> L-RNA
 <400> 102
 cgggagguua gggcuagaag ucggucccg 29
 25 <210> 103
 <211> 27
 <212> RNA
 <213> Sequência artificial
 <220>
 30 <223> sintética
 <220>
 <221> misc_feature

<222> (1)..(27)
 <223> L-RNA
 <400> 103
 gggagguuag ggcuaagaagu cggucce 27
 5 <210> 104
 <211> 27
 <212> RNA
 <213> Sequência artificial
 <220>
 10 <223> sintética
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(27)
 <223> L-RNA
 15 <400> 104
 ccgcgguuag ggcuaagaagu cgggcgg 27
 <210> 105
 <211> 27
 <212> RNA
 20 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> sintética
 <220>
 <221> misc_feature
 25 <222> (1)..(27)
 <223> L-RNA
 <400> 105
 cccggguuag ggcuaagaagu cggcggg 27
 <210> 106
 30 <211> 27
 <212> RNA
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> sintética
 <220>
 <221> misc_feature
 5 <222> (1)..(27)
 <223> L-RNA
 <400> 106
 ggcgguuag ggcuaagaagu cggcgcc 27
 <210> 107
 10 <211> 29
 <212> RNA
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> sintética
 15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(29)
 <223> L-RNA
 <400> 107
 20 cccgcgguua gggcuagaag ucgggcggg 29
 <210> 108
 <211> 29
 <212> RNA
 <213> Sequência artificial
 25 <220>
 <223> sintética
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(29)
 30 <223> L-RNA
 <400> 108
 gccgcgguua gggcuagaag ucgggcggc 29

```

    <210> 109
    <211> 29
    <212> RNA
    <213> Sequência artificial
5  <220>
    <223> sintética
    <220>
    <221> misc_feature
    <222> (1)..(29)
10 <223> L-RNA
    <400> 109
    ccccgggguua gggcuagaag ucggcgggg 29
    <210> 110
    <211> 29
    <212> RNA
15 <213> Sequência artificial
    <220>
    <223> sintética
    <220>
20 <221> misc_feature
    <222> (1)..(29)
    <223> L-RNA
    <400> 110
    cggcgggguua gggcuagaag ucggcgccg 29
25 <210> 111
    <211> 29
    <212> RNA
    <213> Sequência artificial
    <220>
30 <223> sintética
    <220>
    <221> misc_feature

```

<222> (1)..(29)
 <223> L-RNA
 <400> 111
 gggcggguua gggcuagaag ucggcgccc 29
 5 <210> 112
 <211> 37
 <212> RNA
 <213> Sequência artificial
 <220>
 10 <223> sintética
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(37)
 <223> L-RNA
 15 <400> 112
 ugcugcgggg guuagggcua gaagucggcc ugcagca 37
 <210> 113
 <211> 35
 <212> RNA
 20 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> sintética
 <220>
 <221> misc_feature
 25 <222> (1)..(35)
 <223> L-RNA
 <400> 113
 gcugcggggg uuagggcuag aagucggccu gcagc 35
 <210> 114
 30 <211> 33
 <212> RNA
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> sintética
 <220>
 <221> misc_feature
 5 <222> (1)..(33)
 <223> L-RNA
 <400> 114
 cugcgggggu uagggcuaga agucggccug cag 33
 <210> 115
 10 <211> 31
 <212> RNA
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> sintética
 15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(31)
 <223> L-RNA
 <400> 115
 20 ugcggggggu agggcuagaa gucggccugc a 31
 <210> 116
 <211> 29
 <212> RNA
 <213> Sequência artificial
 25 <220>
 <223> sintética
 <220>
 <221> L-RNA
 <222> (1)..(29)
 30 <223>
 <400> 116
 gcggggguua gggcuagaag ucggccugc 29

<210> 117
 <211> 29
 <212> RNA
 <213> Sequência artificial
 5 <220>
 <223> sintética
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(29)
 10 <223> L-RNA
 <400> 117
 gccggggguu gggcuagaag ucggccggc 29
 <210> 118
 <211> 31
 15 <212> RNA
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> sintética
 <220>
 20 <221> misc_feature
 <222> (1)..(31)
 <223> L-RNA
 <400> 118
 ggccggggguu agggcuagaa gucggccggc c 31
 25 <210> 119
 <211> 31
 <212> RNA
 <213> Sequência artificial
 <220>
 30 <223> sintética
 <220>
 <221> misc_feature

<222> (1)..(31)
 <223> L-RNA
 <400> 119
 cgccggggguu agggcuagaa gucggccggc g 31
 5 <210> 120
 <211> 10
 <212> RNA
 <213> Sequência artificial
 <220>
 10 <223> sintética
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(10)
 <223> L-RNA
 15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> nucleotídeo = a, g, c ou u
 <400> 120
 20 rksbusnvgr 10
 <210> 121
 <211> 10
 <212> RNA
 <213> Sequência artificial
 25 <220>
 <223> sintética
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(10)
 30 <223> L-RNA
 <220>
 <221> misc_feature

	<222> (3)..(3)	
	<223> n é qualquer nucleotídeo	
	<220>	
	<221> misc_feature	
5	<222> (3)..(3)	
	<223> nucleotídeo = a, g, c ou u	
	<400> 121	
	yynrcassmy	10
	<210> 122	
10	<211> 10	
	<212> RNA	
	<213> Sequência artificial	
	<220>	
	<223> sintética	
15	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (1)..(10)	
	<223> L-RNA	
	<400> 122	
20	rksbugsvgr	10
	<210> 123	
	<211> 10	
	<212> RNA	
	<213> Sequência artificial	
25	<220>	
	<223> sintética	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (1)..(10)	
30	<223> L-RNA	
	<220>	
	<221> misc_feature	

	<222>	(3)..(3)	
	<223>	n é qualquer nucleotídeo	
	<220>		
	<221>	misc_feature	
5	<222>	(3)..(3)	
	<223>	nucleotídeo = a, g, c ou u	
	<400>	123	
	ycnrcassmy		10
	<210>	124	
10	<211>	5	
	<212>	RNA	
	<213>	Sequência artificial	
	<220>		
	<223>	sintética	
15	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<222>	(1)..(5)	
	<223>	L-RNA	
	<220>		
20	<221>	S ou ausente	
	<222>	(1)..(1)	
	<223>		
	<220>		
	<221>	misc_feature	
25	<222>	(1)..(1)	
	<223>	S ou ausente	
	<400>	124	
	ssssv		5
	<210>	125	
30	<211>	5	
	<212>	RNA	
	<213>	Sequência artificial	

	<220>	
	<223> sintética	
	<220>	
	<221> misc_feature	
5	<222> (1)..(5)	
	<223> L-RNA	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (5)..(5)	
10	<223> S ou ausente	
	<400> 125	
	bssss	5
	<210> 126	
	<211> 5	
15	<212> RNA	
	<213> Sequência artificial	
	<220>	
	<223> sintética	
	<220>	
20	<221> misc_feature	
	<222> (1)..(5)	
	<223> L-RNA	
	<400> 126	
	sggsv	5
25	<210> 127	
	<211> 5	
	<212> RNA	
	<213> Sequência artificial	
	<220>	
30	<223> sintética	
	<220>	
	<221> misc_feature	

	<222>	(1)..(5)	
	<223>	L-RNA	
	<400>	127	
	ysccs		5
5	<210>	128	
	<211>	5	
	<212>	RNA	
	<213>	Sequência artificial	
	<220>		
10	<223>	sintética	
	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<222>	(1)..(5)	
	<223>	L-RNA	
15	<400>	128	
	gcsgg		5
	<210>	129	
	<211>	5	
	<212>	RNA	
20	<213>	Artificial	
	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<222>	(1)..(5)	
	<223>	L-RNA	
25	<400>	129	
	cckgc		5
	<210>	130	
	<211>	5	
	<212>	RNA	
30	<213>	Sequência artificial	
	<220>		
	<223>	sintética	

	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (1)..(5)	
	<223> L-RNA	
5	<400> 130	
	ssssr	5
	<210> 131	
	<211> 5	
	<212> RNA	
10	<213> Sequência artificial	
	<220>	
	<223> sintética	
	<220>	
	<221> misc_feature	
15	<222> (1)..(5)	
	<223> L-RNA	
	<400> 131	
	ysbss	5
	<210> 132	
20	<211> 45	
	<212> RNA	
	<213> Sequência artificial	
	<220>	
	<223> sintética	
25	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (1)..(45)	
	<223> L-RNA	
	<220>	
30	<221> misc_feature	
	<222> (1)..(1)	
	<223> 40 kDa-PEG	

	<400>	132	
		gcguggugug aucuagaugu auuggcugau ccuagucagg uacgc	45
	<210>	133	
	<211>	36	
5	<212>	RNA	
	<213>	Sequência artificial	
	<220>		
	<223>	sintética	
	<220>		
10	<221>	misc_feature	
	<222>	(1)..(36)	
	<223>	L-RNA	
	<220>		
	<221>	misc_feature	
15	<222>	(1)..(1)	
	<223>	40 kDa-PEG	
	<400>	133	
		gcgugaaagc aacaugucuaa ugaaagguag ccgcgc	36
	<210>	134	
20	<211>	29	
	<212>	RNA	
	<213>	Sequência artificial	
	<220>		
	<223>	sintética	
25	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<222>	(1)..(29)	
	<223>	L-RNA	
	<220>		
30	<221>	misc_feature	
	<222>	(1)..(1)	
	<223>	40 kDa-PEG	

<400> 134
 cgggagguua gggcuagaag ucggucccg 29
 <210> 135
 <211> 29
 5 <212> RNA
 <213> Artificial
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(29)
 10 <223> L-RNA
 <220>
 <221> 40 kDa-PEG
 <222> (1)..(1)
 <223>
 15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 40 kDa-PEG
 <400> 135
 20 gccgggguua gggcuagaag ucggccggc 29
 <210> 136
 <211> 31
 <212> RNA
 <213> Sequência artificial
 25 <220>
 <223> sintética
 <220>
 <221> L-RNA
 <222> (1)..(31)
 30 <223>
 <220>
 <221> 40 kDa-PEG

	<222>	(1)..(1)	
	<223>		
	<220>		
	<221>	misc_feature	
5	<222>	(1)..(1)	
	<223>	40 kDa-PEG	
	<400>	136	
		cgccggggguu agggcuagaa gucggccggc g	31
	<210>	137	
10	<211>	38	
	<212>	RNA	
	<213>	Sequência artificial	
	<220>		
	<223>	sintética	
15	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<222>	(1)..(38)	
	<223>	L-RNA	
	<220>		
20	<221>	40 kDa-PEG-	
	<222>	(1)..(1)	
	<223>		
	<220>		
	<221>	misc_feature	
25	<222>	(1)..(1)	
	<223>	40 kDa-PEG-	
	<400>	137	
		gcugugaaag caacauguca augaaaggua gccgcagc	38
	<210>	138	
30	<211>	40	
	<212>	RNA	
	<213>	Sequência artificial	

```

    <220>
    <223>  sintética
    <220>
    <221>  misc_feature
5    <222>  (1)..(40)
    <223>  L-RNA
    <400>  138
    uaaggaaacu cggucugaug cgguagcgcg gugcagagcu
    <210>  139
10   <211>  38
    <212>  RNA
    <213>  Artificial
    <220>
    <221>  misc_feature
15   <222>  (1)..(38)
    <223>  L-RNA
    <220>
    <221>  misc_feature
    <222>  (1)..(1)
20   <223>  30 kDa-PEG
    <400>  139
    gcugugaaag caacauguca augaaaggua gccgcagc
    <210>  140
    <211>  38
25   <212>  RNA
    <213>  Artificial
    <220>
    <221>  misc_feature
    <222>  (1)..(38)
30   <223>  L-RNA
    <220>
    <221>  misc_feature

```

<222> (1)..(1)
 <223> 100 kDa-HES
 <400> 140
 gcugugaaag caacauguca augaaaggua gccgcagc 38
 5 <210> 141
 <211> 38
 <212> RNA
 <213> Sequência artificial
 <220>
 10 <223> sintética
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(38)
 <223> L-RNA
 15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 130 kDa-HES
 <400> 141
 20 gcugugaaag caacauguca augaaaggua gccgcagc 38
 <210> 142
 <211> 48
 <212> RNA
 <213> Sequência artificial
 25 <220>
 <223> sintética
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(48)
 30 <223> L-RNA
 <400> 142
 cgugguccgu ugugucaggu cuauucgccc cggugcaggg cauccgcg 48

<210> 143
 <211> 49
 <212> RNA
 <213> Sequência artificial
 5 <220>
 <223> sintética
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(49)
 10 <223> L-RNA
 <400> 143
 gcagugugac gcggacguga uaggacagag cugaucggc ucaggugag 49
 <210> 144
 <211> 49
 15 <212> RNA
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> sintética
 <220>
 20 <221> misc_feature
 <222> (1)..(49)
 <223> L-RNA
 <400> 144
 caacagcagu gugacgcgga cgugauagga cagagcugau cccgcucag 49
 25 <210> 145
 <211> 38
 <212> RNA
 <213> Sequência artificial
 <220>
 30 <223> sintética
 <400> 145
 gcugugaaag caacaugua augaaaggua gccgcagc 38

	<210>	146	
	<211>	38	
	<212>	RNA	
	<213>	Sequência artificial	
5	<220>		
	<223>	sintética	
	<400>	146	
		gcugugaaag uaacauguca augaaaggua accacagc	38
	<210>	147	
10	<211>	38	
	<212>	RNA	
	<213>	Sequência artificial	
	<220>		
	<223>	sintética	
15	<400>	147	
		gcugugaaag uaacacguca augaaaggua accgcagc	38
	<210>	148	
	<211>	38	
	<212>	RNA	
20	<213>	Sequência artificial	
	<220>		
	<223>	sintética	
	<400>	148	
		gcugugaaag uaacacguca augaaaggua accacagc	38
25	<210>	149	
	<211>	38	
	<212>	RNA	
	<213>	Sequência artificial	
	<220>		
30	<223>	sintética	
	<400>	149	
		gcuguaaaaag uaacauguca augaaaggua acuacagc	38

	<210>	150	
	<211>	38	
	<212>	RNA	
	<213>	Sequência artificial	
5	<220>		
	<223>	sintética	
	<400>	150	
		gcuguaaaaag uaacaaguca augaaaggua acuacagc	38
	<210>	151	
10	<211>	38	
	<212>	RNA	
	<213>	Sequência artificial	
	<220>		
	<223>	sintética	
15	<400>	151	
		gcugugaaaag uaacaaguca augaaaggua accacagc	38
	<210>	152	
	<211>	38	
	<212>	RNA	
20	<213>	Sequência artificial	
	<220>		
	<223>	sintética	
	<400>	152	
		gcagugaaaag uaacauguca augaaaggua accacagc	38
25	<210>	153	
	<211>	38	
	<212>	RNA	
	<213>	Sequência artificial	
	<220>		
30	<223>	sintética	
	<400>	153	
		gcugugaaaag uaacauguca augaaaggua accacugc	38

	<210>	154	
	<211>	38	
	<212>	RNA	
	<213>	Sequência artificial	
5	<220>		
	<223>	sintética	
	<400>	154	
		gcuaugaaag uaacauguca augaaaggua accauagc	38
	<210>	155	
10	<211>	38	
	<212>	RNA	
	<213>	Sequência artificial	
	<220>		
	<223>	sintética	
15	<400>	155	
		gcugcgaaag cgacauguca augaaaggua gccgcagc	38
	<210>	156	
	<211>	38	
	<212>	RNA	
20	<213>	Sequência artificial	
	<220>		
	<223>	sintética	
	<400>	156	
		gcugugaaag caacauguca augaaaggua gccacagc	38
25	<210>	157	
	<211>	38	
	<212>	RNA	
	<213>	Sequência artificial	
	<220>		
30	<223>	sintética	
	<220>		
	<221>	sintética	

	<222> (1)..(38)	
	<223>	
	<400> 157	
	gcugugaaag uaacauguca augaaaggua gccgcagc	38
5	<210> 158	
	<211> 39	
	<212> RNA	
	<213> Sequência artificial	
	<220>	
10	<223> sintética	
	<400> 158	
	agcgugaaag uaacacguua aaugaaaggu aaccacgcu	39
	<210> 159	
	<211> 36	
15	<212> RNA	
	<213> Sequência artificial	
	<220>	
	<223> sintética	
	<400> 159	
20	cugugaaagc aacaugucua ugaaagguag ccgcag	36
	<210> 160	
	<211> 34	
	<212> RNA	
	<213> Sequência artificial	
25	<220>	
	<223> sintética	
	<400> 160	
	ugugaaagca acaugucaau gaaagguagc cgca	34
	<210> 161	
30	<211> 32	
	<212> RNA	
	<213> Sequência artificial	

	<220>	
	<223> sintética	
	<400> 161	
	gugaaagcaa caugucaaug aaagguagcc gc	32
5	<210> 162	
	<211> 30	
	<212> RNA	
	<213> Sequência artificial	
	<220>	
10	<223> sintética	
	<400> 162	
	ugaaagcaac augucaauga aagguagccg	30
	<210> 163	
	<211> 28	
15	<212> RNA	
	<213> Sequência artificial	
	<220>	
	<223> sintética	
	<400> 163	
20	gaaagcaaca ugucaaugaa agguagcc	28
	<210> 164	
	<211> 26	
	<212> RNA	
	<213> Sequência artificial	
25	<220>	
	<223> sintética	
	<400> 164	
	aaagcaacau gucaaugaaa gguagc	26
	<210> 165	
30	<211> 36	
	<212> RNA	
	<213> Sequência artificial	

	<220>		
	<223> sintética		
	<400> 165		
	gcgugaaagc aacaugucuaa ugaaagguag ccgcgc	36	
5	<210> 166		
	<211> 36		
	<212> RNA		
	<213> Sequência artificial		
	<220>		
10	<223> sintética		
	<400> 166		
	gcgcgaaagc aacaugucuaa ugaaagguag ccgcgc	36	
	<210> 167		
	<211> 34		
15	<212> RNA		
	<213> Sequência artificial		
	<220>		
	<223> sintética		
	<400> 167		
20	gcggaagca acaugucaau gaaagguagc ccgc	34	
	<210> 168		
	<211> 34		
	<212> RNA		
	<213> Sequência artificial		
25	<220>		
	<223> sintética		
	<400> 168		
	cgugaaagca acaugucaau gaaagguagc cgcg	34	
	<210> 169		
30	<211> 34		
	<212> RNA		
	<213> Sequência artificial		

	<220>		
	<223> sintética		
	<400> 169		
	gcgcaaagca acaugucaau gaaagguagc gugc	34	
5	<210> 170		
	<211> 34		
	<212> RNA		
	<213> Sequência artificial		
	<220>		
10	<223> sintética		
	<400> 170		
	gugcaaagca acaugucaau gaaagguagc gcgc	34	
	<210> 171		
	<211> 34		
15	<212> RNA		
	<213> Sequência artificial		
	<220>		
	<223> sintética		
	<400> 171		
20	cgcgaaagca acaugucaau gaaagguagc cgug	34	
	<210> 172		
	<211> 34		
	<212> RNA		
	<213> Sequência artificial		
25	<220>		
	<223> sintética		
	<400> 172		
	gggcaaagca acaugucaau gaaagguagc gccc	34	
	<210> 173		
30	<211> 34		
	<212> RNA		
	<213> Sequência artificial		

	<220>	
	<223> sintética	
	<400> 173	
	ggccaaagca acaugucaau gaaagguagc ggcc	34
5	<210> 174	
	<211> 34	
	<212> RNA	
	<213> Sequência artificial	
	<220>	
10	<223> sintética	
	<400> 174	
	gcccaaagca acaugucaau gaaagguagc gggc	34
	<210> 175	
	<211> 34	
15	<212> RNA	
	<213> Sequência artificial	
	<220>	
	<223> sintética	
	<400> 175	
20	ccccaagca acaugucaau gaaagguagc gggg	34
	<210> 176	
	<211> 47	
	<212> RNA	
	<213> Sequência artificial	
25	<220>	
	<223> sintética	
	<400> 176	
	agcguggugu gaucuagaug uaguggcuga uccuagucag guacgcu	47
	<210> 177	
30	<211> 47	
	<212> RNA	
	<213> Sequência artificial	

	<220>	
	<223> sintética	
	<400> 177	
	agcguggugu gaucuagaug uauuggcuga uccuagucag guacgcu	47
5	<210> 178	
	<211> 47	
	<212> RNA	
	<213> Sequência artificial	
	<220>	
10	<223> sintética	
	<400> 178	
	agcguggugu gaucuagaug uaauggcuga uccuagucag gugcgcu	47
	<210> 179	
	<211> 45	
15	<212> RNA	
	<213> Sequência artificial	
	<220>	
	<223> sintética	
	<400> 179	
20	gcgaggugug aucuagaugu aguggcugau ccuagucagg ugcgc	45
	<210> 180	
	<211> 45	
	<212> RNA	
	<213> Sequência artificial	
25	<220>	
	<223> sintética	
	<400> 180	
	gcguggugug aucuagaugu aguggcugau ccuagucagg ugcgc	45
	<210> 181	
30	<211> 45	
	<212> RNA	
	<213> Sequência artificial	

	<220>		
	<223> sintética		
	<400> 181		
	gcaugggugug aucuagaugu aguggcugau ccuagucagg ugccc	45	
5	<210> 182		
	<211> 45		
	<212> RNA		
	<213> Sequência artificial		
	<220>		
10	<223> sintética		
	<400> 182		
	gcgugggugug aucuagaugu aauggcugau ccuagucagg gacgc	45	
	<210> 183		
	<211> 45		
15	<212> RNA		
	<213> Sequência artificial		
	<220>		
	<223> sintética		
	<400> 183		
20	gcgugggugug aucuagaugu agaggcugau ccuagucagg uacgc	45	
	<210> 184		
	<211> 45		
	<212> RNA		
	<213> Sequência artificial		
25	<220>		
	<223> sintética		
	<400> 184		
	gcgugggugug aucuagaugu aaaggcugau ccuagucagg uacgc	45	
	<210> 185		
30	<211> 45		
	<212> RNA		
	<213> Sequência artificial		

	<220>		
	<223> sintética		
	<400> 185		
	gcguggugug aucuagaugu aguggcuguu ccuagucagg uaugc	45	
5	<210> 186		
	<211> 45		
	<212> RNA		
	<213> Sequência artificial		
	<220>		
10	<223> sintética		
	<400> 186		
	gcguggugug aucuagaugu aguggcugau ccuaguuagg uacgc	45	
	<210> 187		
	<211> 45		
15	<212> RNA		
	<213> Sequência artificial		
	<220>		
	<223> sintética		
	<400> 187		
20	gcguggugug aucuagaugu aguggcugau ccuagucagg uacgc	45	
	<210> 188		
	<211> 43		
	<212> RNA		
	<213> Sequência artificial		
25	<220>		
	<223> sintética		
	<400> 188		
	cgugguguga ucuagaugua guggcugauc cuagucaggu acg	43	
	<210> 189		
30	<211> 41		
	<212> RNA		
	<213> Sequência artificial		

	<220>		
	<223> sintética		
	<400> 189		
	guggugugau cuagauguag uggcugaucc uagucaggua c	41	
5	<210> 190		
	<211> 39		
	<212> RNA		
	<213> Sequência artificial		
	<220>		
10	<223> sintética		
	<400> 190		
	uggugugauc uagauguagu ggcugauccu agucaggua	39	
	<210> 191		
	<211> 37		
15	<212> RNA		
	<213> Sequência artificial		
	<220>		
	<223> sintética		
	<400> 191		
20	ggugugaucu agauguagug gcugauccua gucaggu	37	
	<210> 192		
	<211> 35		
	<212> RNA		
	<213> Sequência artificial		
25	<220>		
	<223> sintética		
	<400> 192		
	gugugaucua gauguagugg cugauccuag ucagg	35	
	<210> 193		
30	<211> 45		
	<212> RNA		
	<213> Sequência artificial		

	<220>		
	<223> sintética		
	<400> 193		
	gcguggugug aucuagaugu auuggcugau ccuagucagg uacgc	45	
5	<210> 194		
	<211> 45		
	<212> RNA		
	<213> Sequência artificial		
	<220>		
10	<223> sintética		
	<400> 194		
	gcgcgugug aucuagaugu auuggcugau ccuagucagg cgcg	45	
	<210> 195		
	<211> 43		
15	<212> RNA		
	<213> Sequência artificial		
	<220>		
	<223> sintética		
	<400> 195		
20	gcgcguguga ucuagaugua uuggcugauc cuagucaggg cgc	43	
	<210> 196		
	<211> 43		
	<212> RNA		
	<213> Sequência artificial		
25	<220>		
	<223> sintética		
	<400> 196		
	ggcguguga ucuagaugua uuggcugauc cuagucaggg ccc	43	
	<210> 197		
30	<211> 43		
	<212> RNA		
	<213> Sequência artificial		

	<220>		
	<223> sintética		
	<400> 197		
	ggccguguga ucuagaugua uggcugauc cuagucaggg gcc	43	
5	<210> 198		
	<211> 43		
	<212> RNA		
	<213> Sequência artificial		
	<220>		
10	<223> sintética		
	<400> 198		
	ggccguguga ucuagaugua uggcugauc cuagucaggg ggc	43	
	<210> 199		
	<211> 39		
15	<212> RNA		
	<213> Sequência artificial		
	<220>		
	<223> sintética		
	<400> 199		
20	gugcugcggg gguuagggcu agaagucggc cugcagcac	39	
	<210> 200		
	<211> 39		
	<212> RNA		
	<213> Sequência artificial		
25	<220>		
	<223> sintética		
	<400> 200		
	agcguggcga gguuagggcu agaagucggu cgacacgcu	39	
	<210> 201		
30	<211> 39		
	<212> RNA		
	<213> Sequência artificial		

	<220>		
	<223> sintética		
	<400> 201		
	guguugcgga gguuagggcu agaagucggu cagcagcac	39	
5	<210> 202		
	<211> 48		
	<212> RNA		
	<213> Sequência artificial		
	<220>		
10	<223> sintética		
	<400> 202		
	cgugcgcuug agauaggggu uagggcuuaa agucggcuga uucucacg	48	
	<210> 203		
	<211> 39		
15	<212> RNA		
	<213> Sequência artificial		
	<220>		
	<223> sintética		
	<400> 203		
20	agcgugaagg gguuagggcu cgaagucggc ugacacgcu	39	
	<210> 204		
	<211> 39		
	<212> RNA		
	<213> Sequência artificial		
25	<220>		
	<223> sintética		
	<400> 204		
	gugcugcggg gguuagggcu cgaagucggc ccgcagcac	39	
	<210> 205		
30	<211> 39		
	<212> RNA		
	<213> Sequência artificial		

	<220>		
	<223> sintética		
	<400> 205		
	guguucccg gguuagggcu ugaagucggc cggcagcac	39	
5	<210> 206		
	<211> 39		
	<212> RNA		
	<213> Sequência artificial		
	<220>		
10	<223> sintética		
	<400> 206		
	guguugcagg gguuagggcu ugaagucggc cugcagcac	39	
	<210> 207		
	<211> 39		
15	<212> RNA		
	<213> Sequência artificial		
	<220>		
	<223> sintética		
	<400> 207		
20	gugcugcggg gguuagggcu caaagucggc cugcagcac	39	
	<210> 208		
	<211> 38		
	<212> RNA		
	<213> Sequência artificial		
25	<220>		
	<223> sintética		
	<400> 208		
	gugcugccgg gguuagggcu aaagucggcc gacagcac	38	
	<210> 209		
30	<211> 39		
	<212> RNA		
	<213> Sequência artificial		

	<220>		
	<223> sintética		
	<400> 209		
	gugcuguggg ggucagggcu agaagucggc cugcagcac	39	
5	<210> 210		
	<211> 38		
	<212> RNA		
	<213> Sequência artificial		
	<220>		
10	<223> sintética		
	<400> 210		
	ugagauaggg guuagggcuu aaagucggcu gauucua	38	
	<210> 211		
	<211> 36		
15	<212> RNA		
	<213> Sequência artificial		
	<220>		
	<223> sintética		
	<400> 211		
20	gagauagggg uuagggcuua aagucggcug auucuc	36	
	<210> 212		
	<211> 29		
	<212> RNA		
	<213> Sequência artificial		
25	<220>		
	<223> sintética		
	<400> 212		
	gggguuaggg cuuaaagucg gcugauucu	29	
	<210> 213		
30	<211> 37		
	<212> RNA		
	<213> Sequência artificial		

	<220>	
	<223> sintética	
	<400> 213	
	gcguggcgag guuagggcua gaagucgguc gacacgc	37
5	<210> 214	
	<211> 35	
	<212> RNA	
	<213> Sequência artificial	
	<220>	
10	<223> sintética	
	<400> 214	
	cguggcgagg uuagggcuag aagucggucg acacg	35
	<210> 215	
	<211> 33	
15	<212> RNA	
	<213> Sequência artificial	
	<220>	
	<223> sintética	
	<400> 215	
20	cgggcgaggu uagggcuaga agucggucga ccg	33
	<210> 216	
	<211> 33	
	<212> RNA	
	<213> Sequência artificial	
25	<220>	
	<223> sintética	
	<400> 216	
	cgggcgaggu uagggcuaga agucggucgc ccg	33
30	<210> 217	
	<211> 31	
	<212> RNA	

	<213> Sequência artificial	
	<220>	
	<223> sintética	
	<400> 217	
5	cggcgagguu agggcuagaa gucggucgcc g	31
	<210> 218	
	<211> 29	
	<212> RNA	
	<213> Sequência artificial	
10	<220>	
	<223> sintética	
	<400> 218	
	cgggagguua gggcuagaag ucggucccg	29
	<210> 219	
15	<211> 27	
	<212> RNA	
	<213> Sequência artificial	
	<220>	
	<223> sintética	
20	<400> 219	
	gggagguuag ggcuaagaagu cgguccc	27
	<210> 220	
	<211> 27	
	<212> RNA	
25	<213> Sequência artificial	
	<220>	
	<223> sintética	
	<400> 220	
	ccgcgguuag ggcuaagaagu cgggcgg	27
30	<210> 221	
	<211> 27	
	<212> RNA	

	<213> Sequência artificial	
	<220>	
	<223> sintética	
	<400> 221	
5	cccgguuag ggcuaagaagu cggcggg	27
	<210> 222	
	<211> 27	
	<212> RNA	
	<213> Sequência artificial	
10	<220>	
	<223> sintética	
	<400> 222	
	ggcggguuag ggcuaagaagu cggcgcc	27
	<210> 223	
15	<211> 29	
	<212> RNA	
	<213> Sequência artificial	
	<220>	
	<223> sintética	
20	<400> 223	
	cccgcgguua gggcuagaag ucgggcggg	29
	<210> 224	
	<211> 29	
	<212> RNA	
25	<213> Sequência artificial	
	<220>	
	<223> sintética	
	<400> 224	
	gccgcgguaa gggcuagaag ucgggcggc	29
30	<210> 225	
	<211> 29	
	<212> RNA	

	<213> Sequência artificial	
	<220>	
	<223> sintética	
	<400> 225	
5	ccccgguua gggcuagaag ucggcggg	29
	<210> 226	
	<211> 29	
	<212> RNA	
	<213> Sequência artificial	
10	<220>	
	<223> sintética	
	<400> 226	
	cggcggguua gggcuagaag ucggcgccg	29
	<210> 227	
15	<211> 29	
	<212> RNA	
	<213> Sequência artificial	
	<220>	
	<223> sintética	
20	<400> 227	
	gggcggguua gggcuagaag ucggcgccc	29
	<210> 228	
	<211> 37	
	<212> RNA	
25	<213> Sequência artificial	
	<220>	
	<223> sintética	
	<400> 228	
	ugcugcgggg guuagggcua gaagucggcc ugcagca	37
30	<210> 229	
	<211> 35	
	<212> RNA	

	<213> Sequência artificial	
	<220>	
	<223> sintética	
	<400> 229	
5	gcugcggggg uuagggcuag aagucggccu gcagc	35
	<210> 230	
	<211> 33	
	<212> RNA	
	<213> Sequência artificial	
10	<220>	
	<223> sintética	
	<400> 230	
	cugcgggggu uagggcuaga agucggccug cag	33
	<210> 231	
15	<211> 31	
	<212> RNA	
	<213> Sequência artificial	
	<220>	
	<223> sintética	
20	<400> 231	
	ugcggggguu agggcuagaa gucggccugc a	31
	<210> 232	
	<211> 29	
	<212> RNA	
25	<213> Sequência artificial	
	<220>	
	<223> sintética	
	<400> 232	
	gcggggguua gggcuagaag ucggccugc	29
30	<210> 233	
	<211> 29	
	<212> RNA	

	<213> Sequência artificial	
	<220>	
	<223> sintética	
	<400> 233	
5	gccggggguua gggcuagaag ucggccggc	29
	<210> 234	
	<211> 31	
	<212> RNA	
	<213> Sequência artificial	
10	<220>	
	<223> sintética	
	<400> 234	
	ggccggggguu agggcuagaa gucggccggc c	31
	<210> 235	
15	<211> 31	
	<212> RNA	
	<213> Sequência artificial	
	<220>	
	<223> sintética	
20	<400> 235	
	cgccggggguu agggcuagaa gucggccggc g	31
	<210> 236	
	<211> 48	
	<212> RNA	
25	<213> Sequência artificial	
	<220>	
	<223> sintética	
	<400> 236	
	cgugguccgu ugugucaggu cuauucgcc cggugcagg cauccgcg	48
30	<210> 237	
	<211> 49	
	<212> RNA	

<213> Sequência artificial
 <220>
 <223> sintética
 <400> 237
 5 gcagugugac gcggacguga uaggacagag cugaucgcc ucaggugag 49
 <210> 238
 <211> 49
 <212> RNA
 <213> Sequência artificial
 10 <220>
 <223> sintética
 <400> 238
 caacagcagu gugacgcgga cgugauagga cagagcugau cccgcucag 49
 <210> 239
 15 <211> 40
 <212> RNA
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> sintética
 20 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(40)
 <223> L-RNA
 <220>
 25 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> peguilada
 <400> 239
 uaaggaaacu cgguagcgcu gugcagagcu 40
 30 <210> 240
 <211> 13
 <212> RNA

<213> Sequência artificial
 <220>
 <223> sintética
 <220>
 5 <221> misc_feature
 <222> (1)..(13)
 <223> L-RNA
 <220>
 <221> misc_feature
 10 <222> (3)..(3)
 <223> u representa uma t
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (13)..(13)
 15 <223> anexada a -(C18-PEG-espaçador)-(C18-PEG-espaçador)-1-NH2
 <400> 240
 gaucacacca cgc 13
 <210> 241
 <211> 11
 20 <212> RNA
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> sintética
 <220>
 25 <221> misc_feature
 <222> (1)..(11)
 <223> L-RNA
 <220>
 <221> misc_feature
 30 <222> (1)..(1)
 <223> anexada a 5'-NH2-(C18-PEG-espaçador)-(C18-PEG-espaçador)-
 <400> 241
 gcguaccuga c 11

REIVINDICAÇÕES

1. Uma molécula de ácido nucléico, preferencialmente ligando a SDF-1, selecionada entre o grupo compreendendo moléculas de ácido nucléico tipo A, moléculas de ácido nucléico tipo B, moléculas de ácido nucléico tipo C e moléculas de ácido nucléico tendo uma seqüência de ácido nucléico de acordo com qualquer de SEQ. ID. No. 142, SEQ. ID. No. 143 e SEQ. ID. No. 144.

2. A molécula de ácido nucléico de acordo com a reivindicação 1, por meio da qual as moléculas de ácido nucléico tipo A compreendem a seguinte seqüência de nucleotídeos de núcleo:

5' AAAGYRACAHGUMAA_{X_A}UGAAAGGUARC 3' (SEQ.ID. 19)

por meio da qual X_A ou está ausente ou é A.

3. A molécula de ácido nucléico de acordo com a reivindicação 2, por meio da qual as moléculas de ácido nucléico tipo A compreendem uma seqüência de nucleotídeos de núcleo selecionada entre o grupo compreendendo

5' AAAGYRACAHGUMAAUGAAAGGUARC 3' (SEQ. ID. No. 20),

5' AAAGYRACAHGUMAAAUGAAAGGUARC 3' (SEQ. ID. No. 21), e

5' AAAGYAACAAGUCAAUGAAAGGUARC 3' (SEQ. ID. No. 22), preferencialmente a seqüência de nucleotídeos de núcleo compreende 5' AAAGYAACAAGUCAAUGAAAGGUARC 3' (SEQ. ID. No. 22).

4. A molécula de ácido nucléico de acordo com quaisquer das reivindicações 2 e 3, por meio da qual a molécula de ácido nucléico compreende na direção 5'→3' um primeiro trecho de nucleotídeos, a seqüência de nucleotídeos de núcleo, e um segundo trecho de nucleotídeos.

5. A molécula de ácido nucléico de acordo com quaisquer das reivindicações 2 e 3, por meio da qual a molécula de ácido nucléico compreende na direção 5'→3' um segundo trecho de nucleotídeos, a seqüência de nucleotídeos de núcleo, e um primeiro trecho de nucleotídeos.

6. A molécula de ácido nucléico de acordo com a reivindicação 4

e 5, por meio da qual a molécula de ácido nucléico compreende o primeiro e o segundo trecho de nucleotídeos e o referido primeiro e o referido segundo trecho de nucleotídeos opcionalmente hibridizam um com o outro, por meio do qual na hibridização se forma uma estrutura de filamento duplo.

5 7. A molécula de ácido nucléico de acordo com quaisquer das reivindicações 4 a 6, por meio da qual a estrutura de filamento duplo consiste de quatro a seis pares de bases, preferencialmente cinco pares de bases.

8. A molécula de ácido nucléico de acordo com quaisquer das reivindicações 4 a 7, por meio da qual o primeiro trecho de nucleotídeos
10 compreende uma seqüência de nucleotídeos de 5' X₁X₂NNBV 3' (SEQ. ID. No. 44) e o segundo trecho de nucleotídeos compreende uma seqüência de nucleotídeos de 5' BNBX₃X₄ 3' (SEQ. ID. No. 45)

 por meio da qual X₁ ou está ausente ou R, X₂ é S, X₃ é S e X₄ ou está ausente ou Y;

15 ou

 X₁ está ausente, X₂ ou está ausente ou é S, X₃ ou está ausente ou é S e X₄ está ausente.

9. A molécula de ácido nucléico de acordo com quaisquer das reivindicações 4 a 8, por meio da qual o primeiro trecho de nucleotídeos
20 compreende uma seqüência de nucleotídeos de 5' RSHRYR 3' (SEQ. ID. No. 23) e o segundo trecho de nucleotídeos compreende uma seqüência de nucleotídeos de 5' YRYDSY 3' (SEQ. ID. No. 24),

 preferencialmente o primeiro trecho de nucleotídeos compreende uma seqüência de nucleotídeos de 5' GCUGUG 3' e o segundo trecho de
25 nucleotídeos compreende uma seqüência de nucleotídeos de 5' CGCAGC 3'.

10. A molécula de ácido nucléico de acordo com quaisquer das reivindicações 4 a 8, por meio da qual o primeiro trecho de nucleotídeos
30 compreende uma seqüência de nucleotídeos de 5' X₂BBBS 3' (SEQ. ID. No. 42) e o segundo trecho de nucleotídeos compreende uma seqüência de nucleotídeos de 5' SBBVX₃ 3' (SEQ. ID. No. 43),

 por meio da qual X₂ ou está ausente ou é S e X₃ ou está ausente

ou é S;

preferencialmente o primeiro trecho de nucleotídeos compreende uma sequência de nucleotídeos de 5' CUGUG 3' e o segundo trecho de nucleotídeos compreende uma sequência de nucleotídeos de 5' CGCAG 3';

5 ou o primeiro trecho de nucleotídeos compreende uma sequência de nucleotídeos de 5' GCGUG e o segundo trecho de nucleotídeos compreende uma sequência de nucleotídeos de 5' CGCGC 3'.

11. A molécula de ácido nucléico de acordo com quaisquer das reivindicações 2 a 10, por meio da qual a molécula de ácido nucléico tem
10 uma sequência de ácido nucléico de acordo com quaisquer das SEQ. ID. Nos. 5 a 18, 25 a 41, 133, 137, 139 a 141.

12. A molécula de ácido nucléico de acordo com a reivindicação 1, por meio da qual as moléculas de ácido nucléico tipo B compreendem a seguinte sequência de nucleotídeos de núcleo:

15 5' GUGUGAUCUAGAUGUADWGGCUGWUCCUAGUYAGG 3'
(SEQ. ID. No. 57).

13. A molécula de ácido nucléico de acordo com a reivindicação 12, por meio da qual as moléculas de ácido nucléico tipo B compreendem uma sequência de nucleotídeos de núcleo de GUGUGAUCUAGAUGUA-
20 DUGGCUGAUCCUAGUCAGG (SEQ. ID. No. 58):

14. A molécula de ácido nucléico de acordo com quaisquer das reivindicações 12 e 13, por meio da qual a molécula de ácido nucléico compreende na direção 5'→3' um primeiro trecho de nucleotídeos, a sequência de nucleotídeos de núcleo, e um segundo trecho de nucleotídeos.

25 15. A molécula de ácido nucléico de acordo com quaisquer das reivindicações 12 e 13, por meio da qual a molécula de ácido nucléico compreende na direção 5'→3' um segundo trecho de nucleotídeos, a sequência de nucleotídeos de núcleo, e um primeiro trecho de nucleotídeos.

30 16. A molécula de ácido nucléico de acordo com quaisquer das reivindicações 14 e 15, por meio da qual a molécula de ácido nucléico compreende o primeiro e o segundo trecho de nucleotídeos e o referido primeiro e o referido segundo trecho de nucleotídeos opcionalmente hibridizam um

com o outro, por meio da qual na hibridização se forma uma estrutura de filamento duplo.

17. A molécula de ácido nucléico de acordo com quaisquer das reivindicações 14 a 16, por meio da qual a estrutura de filamento duplo consiste de quatro a seis pares de bases, preferencialmente cinco pares de bases.

18. A molécula de ácido nucléico de acordo com quaisquer das reivindicações 14 a 17, por meio da qual o primeiro trecho de nucleotídeos compreende uma seqüência de nucleotídeos de 5' X₁X₂SVNS 3' (SEQ. ID. No. 77) e o segundo trecho de nucleotídeos compreende uma seqüência de nucleotídeos de 5' BVBSX₃X₄ 3' (SEQ. ID. No. 78), por meio da qual

X₁ ou está ausente ou é A, X₂ é G, X₃ é C e X₄ ou está ausente ou é U;
ou

15 X₁ está ausente, X₂ ou está ausente ou é G, X₃ ou está ausente ou é C e X₄ está ausente.

19. A molécula de ácido nucléico de acordo com quaisquer das reivindicações 14 a 18, por meio da qual o primeiro trecho de nucleotídeos compreende uma seqüência de nucleotídeos de 5' X₁GCRWG 3' (SEQ. ID. No. 59) e o segundo trecho de nucleotídeos compreende uma seqüência de nucleotídeos de 5' KRYSCX₄ 3' (SEQ. ID. No. 60), por meio da qual X₁ ou está ausente ou é A, e X₄ ou está ausente ou é U.

20. A molécula de ácido nucléico de acordo com quaisquer das reivindicações 14 a 19, por meio da qual o primeiro trecho de nucleotídeos compreende uma seqüência de nucleotídeos de 5' X₁GCGUG 3' (SEQ. ID. No. 75) e o segundo trecho de nucleotídeos compreende uma seqüência de nucleotídeos de 5' UACGCX₄ 3' (SEQ. ID. No. 76),

por meio da qual X₁ ou está ausente ou é A, e X₄ ou está ausente ou é U,

30 preferencialmente o primeiro trecho de nucleotídeos compreende uma seqüência de nucleotídeos de 5' AGCGUG 3' e o segundo trecho de nucleotídeos compreende uma seqüência de nucleotídeos de

5' UACGCU 3'.

21. A molécula de ácido nucléico de acordo com quaisquer das reivindicações 14 a 18, por meio da qual o primeiro trecho de nucleotídeos compreende uma seqüência de nucleotídeos de 5' X₂SSBS 3' (SEQ. ID. No. 73) e o segundo trecho de nucleotídeos compreende uma seqüência de nucleotídeos de 5' BVSSX₃ 3' (SEQ. ID. No. 74),

por meio da qual X₂ ou está ausente ou G, e X₃ ou está ausente ou C,

preferencialmente o primeiro trecho de nucleotídeos compreende uma seqüência de nucleotídeos de 5' GCGUG 3' e o segundo trecho de nucleotídeos compreende uma seqüência de nucleotídeos de 5' UACGC 3'.

22. A molécula de ácido nucléico de acordo com quaisquer das reivindicações 12 a 21, por meio da qual a molécula de ácido nucléico tem uma seqüência de ácido nucléico de acordo com quaisquer das SEQ. ID. Nos. 46 a 56, 61 a 72, e 132.

23. A molécula de ácido nucléico de acordo com a reivindicação 1, por meio da qual as moléculas de ácido nucléico tipo C compreendem uma seqüência de nucleotídeos de núcleo de GGUYAGGGCUHRX_AAGUCGG (SEQ. ID. No. 90),

por meio da qual X_A ou está ausente ou é A.

24. A molécula de ácido nucléico de acordo com a reivindicação 23, por meio da qual as moléculas de ácido nucléico tipo C compreendem uma seqüência de nucleotídeos de núcleo selecionada entre o grupo compreendendo

5' GGUYAGGGCUHRAAGUCGG 3' (SEQ. ID. No. 91),

5' GGUYAGGGCUHRAGUCGG 3' (SEQ. ID. No. 92), e

5' GGUUAGGGCUHGAAGUCGG 3' (SEQ. ID. No. 93), preferencialmente a seqüência de nucleotídeos de núcleo compreende 5' GGUUAGGGCUHGAAGUCGG 3' (SEQ. ID. No. 93).

25. A molécula de ácido nucléico de acordo com quaisquer das reivindicações 23 e 24, por meio da qual a molécula de ácido nucléico compreende na direção 5'→3' um primeiro trecho de nucleotídeos, a seqüência

de nucleotídeos de núcleo, e um segundo trecho de nucleotídeos.

26. A molécula de ácido nucléico de acordo com quaisquer das reivindicações 23 e 24, por meio da qual a molécula de ácido nucléico compreende na direção 5'→3' um segundo trecho de nucleotídeos, a sequência
5 de nucleotídeos de núcleo, e um primeiro trecho de nucleotídeos.

27. A molécula de ácido nucléico de acordo com as reivindicações 25 e 26, por meio da qual a molécula de ácido nucléico compreende o primeiro e o segundo trecho de nucleotídeos e por meio da qual no mínimo uma parte do referido primeiro trecho e no mínimo uma parte do referido segundo
10 trecho de nucleotídeos opcionalmente hibridizam um com o outro, por meio da qual na hibridização se forma uma estrutura de filamento duplo.

28. A molécula de ácido nucléico de acordo com quaisquer das reivindicações 25 a 27, por meio da qual a extensão do primeiro trecho e a extensão do segundo trecho é individualmente e independentemente 0 a 17
15 nucleotídeos, preferencialmente 4 a 10 nucleotídeos e mais preferencialmente 4 a 6 nucleotídeos.

29. A molécula de ácido nucléico de acordo com quaisquer das reivindicações 27 e 28, por meio da qual a estrutura de filamento duplo compreende 4 a 10 pares de bases, preferencialmente 4 a 6 pares de bases,
20 mais preferencialmente 5 pares de bases.

30. A molécula de ácido nucléico de acordo com a reivindicação 29, por meio da qual a estrutura de filamento duplo compreende 4 a 10 pares de bases consecutivos, preferencialmente 4 a 6 pares de bases consecutivos, mais preferencialmente 5 pares de bases consecutivos.

25 31. A molécula de ácido nucléico de acordo com quaisquer das reivindicações 25 a 30, por meio da qual o primeiro trecho de nucleotídeos compreende uma sequência de nucleotídeos de 5' RKS BUSNVGR 3' (SEQ. ID. No. 120) e o segundo trecho de nucleotídeos compreende uma sequência de nucleotídeos de 5' YYNRCASSMY 3' (SEQ. ID. No. 121),

30 preferencialmente o primeiro trecho de nucleotídeos compreende uma sequência de nucleotídeos de 5' RKS BUGSVGR 3' (SEQ. ID. No. 122) e o segundo trecho de nucleotídeos compreende uma sequência de

nucleotídeos de 5' YCNRCASSMY 3' (SEQ. ID. No. 123).

32. A molécula de ácido nucléico de acordo com quaisquer das reivindicações 25 a 30, por meio da qual o primeiro trecho de nucleotídeos compreende uma seqüência de nucleotídeos de 5' X_SSSSV 3' (SEQ. ID. No. 124) e o segundo trecho de nucleotídeos compreende uma seqüência de nucleotídeos de 5' BSSSX_S 3' (SEQ. ID. No. 125), por meio da qual X_S ou está ausente ou é S.

33. A molécula de ácido nucléico de acordo com quaisquer das reivindicações 25 a 30 e 32, por meio da qual o primeiro trecho de nucleotídeos compreende uma seqüência de nucleotídeos de 5' SSSSR 3' (SEQ. ID. No. 130) e o segundo trecho de nucleotídeos compreende uma seqüência de nucleotídeos de 5' YSBSS 3' (SEQ. ID. No. 131),

preferencialmente o primeiro trecho de nucleotídeos compreende uma seqüência de nucleotídeos de 5' SGGSR 3' (SEQ. ID. No. 126) e o segundo trecho de nucleotídeos compreende uma seqüência de nucleotídeos de 5' YSCCS 3' (SEQ. ID. No. 127).

34. A molécula de ácido nucléico de acordo com quaisquer das reivindicações 25 a 30, 32, e 33 por meio da qual o primeiro trecho de nucleotídeos compreende uma seqüência de nucleotídeos de 5' GCSGG 3' (SEQ. ID. No. 128) e o segundo trecho de nucleotídeos compreende uma seqüência de nucleotídeos de 5' CCKGC 3' (SEQ. ID. No. 129),

preferencialmente o primeiro trecho de nucleotídeos compreende uma seqüência de nucleotídeos de 5' GCCGG 3' e o segundo trecho de nucleotídeos compreende uma seqüência de nucleotídeos de 5' CCGGC 3'.

35. A molécula de ácido nucléico de acordo com quaisquer das reivindicações 25 a 30, por meio da qual o primeiro trecho de nucleotídeos compreende uma seqüência de nucleotídeos de 5' CGUGCGCUUGAGAU-AGG 3' e o segundo trecho de nucleotídeos compreende uma seqüência de nucleotídeos de 5' CUGAUUCUCACG 3'.

36. A molécula de ácido nucléico de acordo com quaisquer das reivindicações 25 a 30, por meio da qual o primeiro trecho de nucleotídeos compreende uma seqüência de nucleotídeos de 5' UGAGAUAGG 3' e o se-

gundo trecho de nucleotídeos compreende uma seqüência de nucleotídeos de 5' CUGAUUCUCA 3'.

37. A molécula de ácido nucléico de acordo com quaisquer das reivindicações 25 a 30, por meio da qual o primeiro trecho de nucleotídeos
5 compreende uma seqüência de nucleotídeos de 5' GAGAUAGG 3' e o segundo trecho de nucleotídeos compreende uma seqüência de nucleotídeos de 5' CUGAUUCUC 3'.

38. A molécula de ácido nucléico de acordo com quaisquer das reivindicações 23 a 37, por meio da qual a molécula de ácido nucléico tem
10 uma seqüência de ácido nucléico de acordo com quaisquer das SEQ. ID. Nos. 79 a 89, 94 a 119, e 134 a 136.

39. A molécula de ácido nucléico de acordo com a reivindicação 1, por meio da qual a molécula de ácido nucléico tem uma seqüência de ácido nucléico de acordo com quaisquer das SEQ. ID. Nos. 142 a 144.

15 40. A molécula de ácido nucléico de acordo com quaisquer das reivindicações 1 a 39, por meio da qual a molécula de ácido nucléico é um antagonista para SDF-1.

41. A molécula de ácido nucléico de acordo com quaisquer das reivindicações 1 a 39, por meio da qual a molécula de ácido nucléico é um
20 antagonista do sistema receptor de SDF-1, por meio da qual preferencialmente o receptor de SDF-1 do sistema receptor de SDF-1 é o CXCR4 receptor.

42. A molécula de ácido nucléico de acordo com quaisquer das reivindicações 1 ou 41, por meio da qual o SDF-1 é um SDF-1 humano e/ou
25 o receptor de SDF-1 do sistema receptor de SDF-1 é um receptor de SDF-1 humano.

43. A molécula de ácido nucléico de acordo com quaisquer das reivindicações 1 a 42, por meio da qual SDF-1 compreende uma seqüência de aminoácido de acordo com a SEQ ID No. 1.

30 44. O ácido nucléico de acordo com quaisquer das reivindicações 1 a 43, em que o ácido nucléico compreende uma modificação.

45. O ácido nucléico de acordo com a reivindicação 44, por meio

da qual a modificação é selecionada entre o grupo compreendendo uma porção HES e uma porção PEG.

46. O ácido nucléico de acordo com a reivindicação 45, por meio da qual a modificação é uma porção PEG consistindo de um PEG reto ou ramificado, por meio da qual o peso molecular da porção PEG tem preferencialmente a partir de cerca de 2 até 180 kD, mais preferencialmente a partir de cerca de 60 até 140 kD e o mais preferencialmente cerca de 40 kD.

47. O ácido nucléico de acordo com a reivindicação 45, por meio da qual a modificação é uma porção HES, por meio da qual preferencialmente o peso molecular da porção HES tem a partir de cerca de 10 até 130 kD, mais preferencialmente a partir de cerca de 30 até 130 kD e o mais preferencialmente cerca de 100 kD.

48. O ácido nucléico de acordo com quaisquer das reivindicações 1 a 47, por meio da qual os nucleotídeos do ácido nucléico são L-nucleotídeos, preferencialmente os nucleotídeos das seqüências de acordo com quaisquer das SEQ. ID. No. 19, 20, 21, 22, 57, 58, 90, 91, 92, e 93.

49. Uma composição farmacêutica compreendendo um ácido nucléico de acordo com quaisquer das reivindicações 1 a 48 e opcionalmente um constituinte adicional, por meio da qual o constituinte adicional é selecionado entre o grupo compreendendo excipientes farmaceuticamente aceitáveis e agentes farmaceuticamente ativos.

50. Uso de um ácido nucléico de acordo com quaisquer das reivindicações 1 a 48 para a fabricação de um medicamento.

51. Uso de acordo com a reivindicação 50, por meio da qual o medicamento é para o tratamento e/ou prevenção de uma doença ou distúrbio, por meio da qual semelhante doença ou distúrbio é mediado por SDF-1, preferencialmente semelhante doença ou distúrbio é selecionado entre o grupo compreendendo doenças do fundo de olho como retinopatia diabética e degeneração macular relacionada com a idade; câncer de mama, ovários, próstata, pâncreas, tiróide, nasofaringe, cólon, pulmão, e estômago; osteossarcoma; melanoma; glioma; medulo- e neuroblastoma; leucemia; síndrome WHIM; síndromes de deficiência imunológica; neovascularização patológica;

inflamação; esclerose múltipla; artrite reumatóide / osteoartrite e nefrite.

52. Uso de acordo com a reivindicação 50, por meio da qual o medicamento é para inibir angiogênese, neovascularização, inflamação e metástase.

5 53. Uso de um ácido nucléico de acordo com quaisquer das reivindicações 1 a 48 para a fabricação de um meio diagnóstico.

54. Uso de acordo com a reivindicação 53, por meio da qual o meio diagnóstico é para o diagnóstico de uma doença, por meio do qual a doença, por meio do qual semelhante doença é mediada por SDF-1, preferencialmente semelhante doença é selecionada entre o grupo compreendendo doenças do fundo de olho como retinopatia diabética e degeneração macular relacionada com a idade; câncer de mama, ovários, próstata, pâncreas, tireóide, nasofaringe, cólon, pulmão, e estômago; osteossarcoma; melanoma; glioma; medulo- e neuroblastoma; leucemia; síndrome WHIM; síndromes de deficiência imunológica; neovascularização patológica; inflamação; esclerose múltipla; artrite reumatóide / osteoartrite e nefrite.

10 15

55. Uso de acordo com a reivindicação 53, por meio da qual o meio diagnóstico é para diagnosticar angiogênese, neovascularização, inflamação e/ou metástase.

20 56. Um complexo compreendendo SDF-1 e um ácido nucléico de acordo com quaisquer das reivindicações 1 a 48, por meio das quais preferencialmente o complexo é um complexo cristalino.

57. Uso de um ácido nucléico de acordo com quaisquer das reivindicações 1 a 48 para a detecção de SDF-1.

25 58. Um método para a triagem de um antagonista de SDF-1 ou um SDF-1 agonista compreendendo as seguintes etapas:

- proporcionar um antagonista de SDF-1 candidato e/ou um SDF-1 agonista candidato,

- proporcionar um ácido nucléico de acordo com quaisquer das reivindicações 1 a 48,

30

- proporcionar um sistema de teste o qual proporciona um sinal na presença de um antagonista de SDF-1 e/ou um SDF-1 agonista, e

- determinar se o antagonista de SDF-1 candidato é um antagonista de SDF-1 e/ou se o SDF-1 agonista candidato é um SDF-1 agonista.

59. Um método para a triagem de um SDF-1 agonista e/ou um antagonista de SDF-1 compreendendo as seguintes etapas:

5 - proporcionar SDF-1 imobilizado para uma fase, preferencialmente uma fase sólida,

 - proporcionar um ácido nucléico de acordo com quaisquer das reivindicações 1 a 48, preferencialmente um ácido nucléico de acordo com quaisquer das reivindicações 1 a 48 o qual é marcado,

10 - adicionar um SDF-1 agonista candidato e/ou um antagonista de SDF-1 candidato, e

 - determinar se o SDF-1 agonista candidato é um SDF-1 agonista e/ou se o antagonista de SDF-1 candidato é um antagonista de SDF-1.

15 60. O método de acordo com a reivindicação 59, caracterizado em que a determinação é realizada de tal modo que é avaliado se o ácido nucléico é substituído pelo SDF-1 agonista candidato ou por um antagonista de SDF-1 candidato.

 61. Um kit para a detecção de SDF-1, compreendendo um ácido nucléico de acordo com quaisquer das reivindicações 1 a 48.

20 62. Um antagonista de SDF-1 obténível pelo método de acordo com quaisquer das reivindicações 58 a 60.

Ácidos nucléicos de ligação de SDF-1 do Tipo A

Nome	nt.	Seqüência: 5' - 3'	Comp.
192-A10-001	38	GCUGUGAAAGCAACAUGUCA-UGAAAGGUAGC CGCAGC	
192-G10	38	GCUGUGAAAGUAACAUGUCA-UGAAAGGUAA CCACAGC	<
192-F10	38	GCUGUGAAAGUAACAUGUCA-UGAAAGGUAA CCCGCAGC	<
192-B11	38	GCUGUGAAAGUAACAUGUCA-UGAAAGGUAA CCACAGC	=
192-C9	38	GCUGUA AAAGUAACAUGUCA-UGAAAGGUAA CUACAGC	<
192-E10	38	GCUGUA AAAGUAACAUGUCA-UGAAAGGUAA CUACAGC	<
192-C10	38	GCUGUGAAAGUAACAUGUCA-UGAAAGGUAA CCACAGC	=
192-D11	38	GC AGUG AAAGUAACAUGUCA-UGAAAGGUAA CCACAGC	<
192-G11	38	GCUGUGAAAGUAACAUGUCA-UGAAAGGUAA CCACUGC	<
192-H11	38	GCUA UG AAAGUAACAUGUCA-UGAAAGGUAA CCAUAGC	<
192-D10	38	GCUG CG AAAGCCAACAUGUCA-UGAAAGGUAGC CGCAGC	<<
192-E9	38	GCUGUGAAAGCAACAUGUCA-UGAAAGGUAGC CCACAGC	<<
192-H9	38	GCUGUGAAAGUAACAUGUCA-UGAAAGGUAGC CGCAGC	<<
191-A6	39	AG CGUG AAAGUAACAUGUAAAUGAAAGGUAA CCACCGCU	<
	26	AAAGYRACA H GU M AAUGAAAGGUAA C	
	26	AAAGYRACA H GU M AA-UGAAAGGUAA C	
	27	AAAGYRACA H GU M AAUGAAAGGUAA C	
	26	AAAGYAACA H GUCAA-UGAAAGGUAA C	
		RSHRYR	
		YRYDSY	

Nucleotídeos terminais que podem hibridizar uns aos outros (negrito)

nucleotídeos os quais podem essencialmente compreender um motivo de ligação de SDF

nt.: nucleotídeos

posição variável ^

FIG. 1

Comp.: = Clones foram testados como aptâmeros em uma prova de ligação de competição vs. 192-A10-001

=: = igual afinidade de ligação que 192-A10-001; <: = afinidade de ligação mais fraca do que 192-A10-001; <<: = afinidade de ligação muito mais fraca do que 192-A10-001

FIG. 1 CONTINUAÇÃO

Derivados de Ácido Nucléico de Ligação de SDF do Tipo A 192-A10-001

Nome	nt.	Seqüência: 5' - 3'	Comp.	PD: K _p [nM]	Biocore K _b [nM]	TAX IC ₅₀ [nM]
192-A10-001	38	GCUGUGAAAGCAACAUGUCAAAUGAAAGGUAGCCGCAGC		1.5	1.0	0.1 - 0.2
192-A10-002	36	CUGUGAAAGCAACAUGUCAAAUGAAAGGUAGCCGCAG	=			=
192-A10-003	34	UGUGAAAGCAACAUGUCAAAUGAAAGGUAGCCGCA	<			<
192-A10-004	32	GUGAAAGCAACAUGUCAAAUGAAAGGUAGCCGC	<<			<<
192-A10-005	30	UGAAAGCAACAUGUCAAAUGAAAGGUAGCCG	<<			<<
192-A10-006	28	GAAAGCAACAUGUCAAAUGAAAGGUAGCC	<<<			
192-A10-007	26	AAAGCAACAUGUCAAAUGAAAGGUAGC	i. a.			

nucleotídeos terminais na extremidade 5' e na 3' que podem hibridizar uns aos outros (negrito) nt.: nucleotídeos

nucleotídeos os quais podem essencialmente compreender um motivo de ligação de SDF

i. a.: = inativo= = igual afinidade de ligação que 192-A10-001

</<<<: = mais fraca (<), muito mais fraca (<<) ou muitíssimo mais fraca (<<<) afinidade de ligação do que 192-A10-001

Comp.: = Clones foram testados como aptâmeros em uma prova de ligação de competição vs. 193-A10-001

PD.: = Clones foram testados como aptâmeros em uma prova de ligação de pull down

TAX: = Clones foram testados como Spiegelmeros em uma prova de quimiotaxia in vitro de cultura celular

FIG. 2A

Derivados de Ácido Nucléico de Ligação de SDF do Tipo A 192-A10-001

Nome	nt.	Seqüência: 5' - 3'	Comp.	PD: K _b [nM]	Blocore: K _b [nM]	TAX IC ₅₀ [nM]
192-A10-001	38	GCUGUGAAAAGCAACAUGUCAAAUGAAAGGUAGCGCAGC		1.5	1.0	0.1 - 0.2
192-A10-002	36	CUGUGAAAAGCAACAUGUCAAAUGAAAGGUAGCGCAG	=			=
192-A10-008	36	GCGUGAAAAGCAACAUGUCAAAUGAAAGGUAGCGCGC	=	1.5	1.4	=
192-A10-015	36	GCGCGAAAAGCAACAUGUCAAAUGAAAGGUAGCGCGC	<	4.6		
192-A10-014	34	GCGCGAAAAGCAACAUGUCAAAUGAAAGGUAGCCGC	<	8.0		=
192-A10-016	34	CGUGAAAAGCAACAUGUCAAAUGAAAGGUAGCGCG	<			
192-A10-017	34	GCGCGAAAAGCAACAUGUCAAAUGAAAGGUAGGUGC	i. a.			
192-A10-018	34	GUGCGAAAAGCAACAUGUCAAAUGAAAGGUAGCGCG	<<<			
192-A10-019	34	GCGCGAAAAGCAACAUGUCAAAUGAAAGGUAGCGUG	<<			
192-A10-020	34	GCGCGAAAAGCAACAUGUCAAAUGAAAGGUAGGCCCC	<<*			
192-A10-021	34	GCGCGAAAAGCAACAUGUCAAAUGAAAGGUAGGCCCC	<<*			
192-A10-022	34	GCCCCAAAAGCAACAUGUCAAAUGAAAGGUAGCGGGC	<<*			
192-A10-023	34	CCCCAAAAGCAACAUGUCAAAUGAAAGGUAGGGGG	<<*			

nucleotídeos terminais na extremidade 5' e na 3' que podem hibridizar uns aos outros (negrito) nt.: nucleotídeos

nucleotídeos os quais podem essencialmente compreender um motivo de ligação de SDF

i.a.: = inativos; = igual afinidade de ligação que 192-A10-001/ -008

</<<<< = mais fraca (<), muito mais fraca (<<) ou muitíssimo mais fraca (<<<) afinidade de ligação do que 192-A10-001/ -008

Comp.: = Clones foram testados como aptâmeros em uma prova de ligação de competição vs. 193-A10-001 (* = com exceção de 192-A10-020, -021, -022, e -023 os quais foram testados vs. 193-A10-008 que tem afinidade de ligação idêntica a SDF-1 que 192-A10-001)

PD.: = Clones foram testados como aptâmeros em uma prova de ligação de pull down

TAX: = Clones foram testados como Spiegelmeros em uma prova de quimiataxia in vitro de cultura celular

FIG. 2B

Ácidos nucléicos de ligação de SDF-1 do Tipo B

Nome	nt.	Seqüência: 5' - 3'	Comp.
193-C2-001	47	AGCGUGGUGUGAUCUAGAUGUAGUGGCUGAUCCUAGUCAGGUACGCU	+
193-G2-001	47	AGCGUGGUGUGAUCUAGAUGUAGUGGCUGAUCCUAGUCAGGUACGCU	+
193-F2-001	47	AGCGUGGUGUGAUCUAGAUGUAGUGGCUGAUCCUAGUCAGGUACGCU	+
193-G1-002	45	GCGAGGUGUGAUCUAGAUGUAGUGGCUGAUCCUAGUCAGGUACGC	<<
193-D2-002	45	GCGUGGUGUGAUCUAGAUGUAGUGGCUGAUCCUAGUCAGGUACGC	<
193-A1-002	45	GCAUGGUGUGAUCUAGAUGUAGUGGCUGAUCCUAGUCAGGUACGC	<<<
193-D3-002	45	GCGUGGUGUGAUCUAGAUGUAGUGGCUGAUCCUAGUCAGGUACGC	<
193-B3-002	45	GCGUGGUGUGAUCUAGAUGUAGUGGCUGAUCCUAGUCAGGUACGC	<<
193-H3-002	45	GCGUGGUGUGAUCUAGAUGUAGUGGCUGAUCCUAGUCAGGUACGC	<
193-E3-002	45	GCGUGGUGUGAUCUAGAUGUAGUGGCUGAUCCUAGUCAGGUACGC	<<
193-D1-002	45	GCGUGGUGUGAUCUAGAUGUAGUGGCUGAUCCUAGUCAGGUACGC	<<<
Fórmula-1 do Tipo B	35	GUGUGAUCUAGAUGUAGUGGCUGAUCCUAGUCAGGUACGC	
Fórmula-2 do Tipo B	35	GUGUGAUCUAGAUGUAGUGGCUGAUCCUAGUCAGGUACGC	
Fórmula-3-5' do Tipo B		X ₁ GCRWG	
Fórmula-3-5' do Tipo B		KRYSCX ₄	

nucleotídeos terminais que podem hibridizar uns aos outros (negrito)

nucleotídeos os quais podem essencialmente compreender um motivo de ligação de SDF

nt.: nucleotídeos posição variável

Comp.: = Clones C2, G2 e F2 foram testados como aptâmeros em uma prova de ligação de competição vs. 192-A10-001; todos os outros clones foram testados como aptâmeros em uma prova de ligação de competição vs. 193-G2-012 que tem a afinidade de ligação idêntica a SDF-1 que 193-G2-001 (vide a Fig. 4B)

+: = melhor afinidade de ligação que 192-A10-001

</<</<<<: = mais fraca (<), muito mais fraca (<<) ou muitíssimo mais fraca (<<<) afinidade de ligação do que 193-G2-001/-012

X₁ = "A" ou ausente

X₄ = "U" ou ausente

FIG. 3

Derivados de Ácido Nucleico de Ligação de SDF do Tipo B 193-C2/G2-001

Nome	nt.	Seqüência: 5' - 3'	Comp.	PD Biocore: K _D [nM]	K _D [nM]
193 - G2 - 001	47	AGCGUGGUGUGAUCUAGAUGUAUUGGCUGAUCCUAGUCAGGUAACGCU		0.3	0.5
193 - C2 - 001	47	AGCGUGGUGUGAUCUAGAUGUAGUGGCUGAUCCUAGUCAGGUAACGCU	=		0.6
193 - C2 - 002	45	GCGUGGUGUGAUCUAGAUGUAGUGGCUGAUCCUAGUCAGGUAACGC	=		0.8
193 - C2 - 003	43	CGUGGUGUGAUCUAGAUGUAGUGGCUGAUCCUAGUCAGGUAACG	<		
193 - C2 - 004	41	GUGGUGUGAUCUAGAUGUAGUGGCUGAUCCUAGUCAGGUAAC	<<		
193 - C2 - 005	39	UGGUGUGAUCUAGAUGUAGUGGCUGAUCCUAGUCAGGUA	<<<		
193 - C2 - 006	37	GGUGUGAUCUAGAUGUAGUGGCUGAUCCUAGUCAGGUA	<<<		
193 - C2 - 007	35	GUGUGAUCUAGAUGUAGUGGCUGAUCCUAGUCAGG	i . a .		

nucleotídeos terminais na extremidade 5' e na 3' que podem hibridizar uns aos outros (negrito) nt.: nucleotídeos
nucleotídeos os quais podem essencialmente compreender um motivo de ligação de SDF i.a.: = inativo =: = igual afinidade de ligação que 193-G2-001
</<</<<<: = mais fraca (<), muito mais fraca (<<) ou muitíssimo mais fraca (<<<) afinidade de ligação do que 193-G2-001
Comp.: = Clones foram testados como aptâmeros em uma prova de ligação de competição vs. 193-G2-001
PD.: = Clones foram testados como aptâmeros em uma prova de ligação de *pull down*

FIG. 4A

Derivados de Ácido Nucléico de Ligação de SDF do Tipo B 193-G2/G2-001

Nome	nt.	Seqüência: 5' - 3'	Comp.	PD Biocore: K _b [nM]	K _b [nM]
193 - G2 - 001	47	AGCGUGGUGUGAUCUAGAUUAUUGGCUGAUCCUAGUCAGGUAACGCU		0.3	0.5
193 - G2 - 012	45	GCUGGUGUGAUCUAGAUUAUUGGCUGAUCCUAGUCAGGUACGC	=	0.3	
193 - G2 - 013	45	GCGCCGUGUGAUCUAGAUUAUUGGCUGAUCCUAGUCAGGCGCGC	<<	5.3	
193 - G2 - 014	43	GCGCCGUGUGAUCUAGAUUAUUGGCUGAUCCUAGUCAGGCGCGC	<<	4.7	
193 - G2 - 015	43	GGGCCGUGUGAUCUAGAUUAUUGGCUGAUCCUAGUCAGGCGCCC	<<*	4.5	
193 - G2 - 016	43	GGGCCGUGUGAUCUAGAUUAUUGGCUGAUCCUAGUCAGGCGCCC	<<*	4.2	
193 - G2 - 017	43	GGCCCGUGUGAUCUAGAUUAUUGGCUGAUCCUAGUCAGGCGGGC	<<*	4.2	

nucleotídeos terminais na extremidade 5' e na 3' que podem hibridizar uns aos outros (negrito) nt.: nucleotídeos

nucleotídeos os quais podem essencialmente compreender um motivo de ligação de SDF

i.a.: = inativo=; = igual afinidade de ligação que 193-G2-001/ -012

</<</<<<: = mais fraca (<), muito mais fraca (<<) ou muitíssimo mais fraca (<<<) afinidade de ligação do que 193-G2-001 3 193-G2-012, respectivamente
Comp.: = Clones foram testados como aptâmeros em uma prova de ligação de competição vs. 193-G2-001(*) = com exceção de 193-G2-015, -016, -022, -017 os quais foram testados vs. em uma prova de ligação de competição vs. 193-G2-012 que tem a afinidade de ligação idêntica a SDF-1 que 193-G2-001)
PD.: = Clones foram testados como aptâmeros em uma prova de ligação de pull down

FIG. 4B

Ácidos nucleicos de ligação de SDF-1 do Tipo C

Nome	nt.	Seqüência: 5' - 3'	Comp.
197-B2	39	GUGUCGCGGGGGUAGGGCUAGAGUCGGCCUGCAGCAC	<
191-D5-001	39	AGCGUGCGGAGGUUAGGGCUAGAGUCGGUCGACACGCU	<
197-H1	39	GUGUDGCGGAGGUUAGGGCUAGAGUCGGUCAGCAGCAC	<
190-D3	48	CGUGCGGCCUAGAGGUUAGGGCUAAGUCGGUCUUUGGCCAACACG	<<
190-A3-001	48	CGUGCGCUUGAGAUAGGGUUAGGGCUAAGUCGGCUGAUUCUCACG	<
190-A3-001*	48	CGUGCGCUUGAGAUAGGGUUAGGGCUAAGUCGGCUGAUUCUCACG	<
190-A2	48	CGUGAUUGGUGAGGGUUAGGGCUAAGUCGGCCUUGUCCAGUCACG	<<
191-A5	39	AGCGUGAAGGGGUUAGGGCUAAGUCGGCUGACACGCU	<<
197-H3	39	GUGUCGCGGGGGUUAGGGCUAAGUCGGCCCGCAGCAC	<
197-B1	39	GUGUUCGCGGGGUUAGGGCUAAGUCGGCCGGCAGCAC	<<
197-E3	39	GUGUUGCAGGGGUUAGGGCUAAGUCGGCCUGCAGCAC	<
197-H2	39	GUGUCGCGGGGGUUAGGGCUAAGUCGGCCUGCAGCAC	<<
197-D1	38	GUGUCGCGGGGGUUAGGGCUAAGUCGGCCGACAGCAC	<<
197-D2	39	GUGUCUGGGGGGUAGGGCUAGAGUCGGCCUGCAGCAC	<<
Fórmula-1 do Tipo C	19	GGUAGGGCUAAGUCGG	
Fórmula-2 do Tipo C	18	GGUAGGGCUAAGUCGG	
Fórmula-3 do Tipo C	19	GGUAGGGCUAAGUCGG	
Fórmula-4 do Tipo C	19	GGUAGGGCUAAGUCGG	

nucleotídeos terminais que podem hibridizar uns aos outros (negrito)

nucleotídeos os quais podem essencialmente compreender um motivo de ligação de SDF

nt.: nucleotídeos posição variável Comp.: = Clones foram testados em uma prova de ligação de competição vs. 192-A10-001

-= = igual afinidade de ligação que 192-A10-001; < = afinidade de ligação mais fraca do que 192-A10; << = afinidade de ligação muito mais fraca do que 192-A10

*.: = hibridização alternativa

FIG. 5

Derivados de Ácido Nucléico de Ligação de SDF do Tipo C 190-A3-001

Nome	nt.	Seqüência: 5' - 3'	Comp.
190 - A3 - 001	48	CGUGCGCUUGAGAUAGG GGUUAGGGCUUAAAGUCGG CUGAUUCUC CACG	
190 - A3 - 001 *	48	CGUGCGCUUGAGAUAGG GGUUAGGGCUUAAAGUCGG CUGAUUCUC CACG	
190 - A3 - 003	38	UGAGAUAGG GGUUAGGGCUUAAAGUCGGCUGAUUC UCA	=
190 - A3 - 004	36	GAGAUAGG GGUUAGGGCUUAAAGUCGG CUGAUUCUC	=
190 - A3 - 007	29	GG GGUUAGGGCUUAAAGUCGG CUGAUUCU	<<<

nucleotídeos terminais na extremidade 5' e na 3' que podem hibridizar uns aos outros (negrito) nt.: nucleotídeos

nucleotídeos os quais podem essencialmente compreender um motivo de ligação de SDF

i.a.: = inativo=; = igual afinidade de ligação que 190-A3-001

</<</<<<: = mais fraca (<), muito mais fraca (<<) ou muitíssimo mais fraca (<<<) afinidade de ligação do que 190-A3-001

Comp.: = Clones foram testados como aptâmeros em uma prova de ligação de competição vs. 190-A3-001

*: = hibridização alternativa aos nucleotídeos terminais

FIG. 6

Derivados de Ácido Nucléico de Ligação de SDF do Tipo C 191-D5-001

Nome	nt.	Seqüência: 5' - 3'	Comp. vs. 191-D5-001	Comp. vs. 191-D5-007	Biocore K _b [nM]
191-D5-001	39	AGCGUGCGGA <u>GGUUAGGGCUAGAA</u> GUCGGU <u>CGACACGCU</u>		<	0.73
191-D5-002	37	GGUGGCGGA <u>GGUUAGGGCUAGAA</u> GUCGGU <u>CGACACGC</u>	=		
191-D5-003	35	CGUGGCGGA <u>GGUUAGGGCUAGAA</u> GUCGGU <u>CGACACG</u>	=		
191-D5-004	33	CG-GGCGA <u>GGUUAGGGCUAGAA</u> GUCGGU <u>CGAC-CG</u>	<		
191-D5-005	33	CG-GGCGA <u>GGUUAGGGCUAGAA</u> GUCGGU <u>CGCC-CG</u>	=		
191-D5-006	31	CG--GCGA <u>GGUUAGGGCUAGAA</u> GUCGGU <u>CGC--CG</u>	=		
191-D5-007	29	CG--G-GA <u>GGUUAGGGCUAGAA</u> GUCGGU <u>UC-C--CG</u>	+		0.75
191-D5-010	27	G--G-GA <u>GGUUAGGGCUAGAA</u> GUCGGU <u>UC-C--C</u>		<	

nucleotídeos terminais na extremidade 5' e na 3' que podem hibridizar uns aos outros (negrito) nt.: nucleotídeos

nucleotídeos os quais podem essencialmente compreender um motivo de ligação de SDF

i.a.: = inativo=: = igual afinidade de ligação que 191-D5-001/ -007

</<</<<<: = mais fraca (<), muito mais fraca (<<) ou muitíssimo mais fraca (<<<) afinidade de ligação do que 191-D5-001/ -007

Comp.: = Clones foram testados como aptâmeros em uma prova de ligação de competição vs. 191-D5-001 ou 191-D5-007 visto que ambos os clones têm a afinidade de ligação idêntica a SDF-1 que 191-D5-001

FIG. 7A

Derivados de Ácido Nucléico de Ligação de SDF do Tipo C 191-D5-001

Nome	nt.	Sequência: 5' - 3'	Comp. vs. 191-D5-007
191-D5-007	29	CG--G-GA GGUUAGGGCUAGAAGUCGGUC -C--CG	
191-D5-010	27	G--G-GA GGUUAGGGCUAGAAGUCGGUC -C--C	<
191-D5-017	27	CCGC GGUUAGGGCUAGAAGUCGG	<
191-D5-029	27	CCCC GGUUAGGGCUAGAAGUCGG CGGG	<
191-D5-024	27	GGCG GGUUAGGGCUAGAAGUCGG CGCC	<
191-D5-017-29a	29	CCCCG GGUUAGGGCUAGAAGUCGG GCGGG	<
191-D5-017-29b	29	GCCGC GGUUAGGGCUAGAAGUCGG GCGGC	<
191-D5-019-29a	29	CCCCG GGUUAGGGCUAGAAGUCGG CGGGG	<
191-D5-024-29a	29	CGGCG GGUUAGGGCUAGAAGUCGG CGCCG	=
191-D5-024-29b	29	GGGCG GGUUAGGGCUAGAAGUCGG CGCCC	=

nucleotídeos terminais na extremidade 5' e na 3' que podem hibridizar uns aos outros (**negrito**) nt.: nucleotídeos

nucleotídeos os quais podem essencialmente compreender um motivo de ligação de SDF

i.a.: = inativo=; = igual afinidade de ligação que 191-D5-007

</<</<<<; = mais fraca (<), muito mais fraca (<<) ou muitíssimo mais fraca (<<<) afinidade de ligação do que 191-D5-007

Comp.: = Clones foram testados como aptâmeros em uma prova de ligação de competição vs. 191-D5-007

FIG. 7B

Nome	nt.	Sequência: 5' - 3'	Comp. vs. 197-B2	Comp. vs. 191-D5-007	Biocore K_D [nM]	TAX IC_{50} [nM]
197-B2	39	GUGCUGCGGGGGUUAGGGCUAGAGUCGGCCUGCAGCAC		=	0.9	0.1-0.2
197-B2-001	37	UGCUGCGGGGGUUAGGGCUAGAGUCGGCCUGCAGCA	=		1.1	
197-B2-002	35	GCUGCGGGGGUUAGGGCUAGAGUCGGCCUGCAGC	=			
197-B2-003	33	CUGCGGGGGUUAGGGCUAGAGUCGGCCUGCAG	=			
197-B2-004	31	UGCUGGGGGUUAGGGCUAGAGUCGGCCUGCA	=			
197-B2-005	29	GCGGGGGUUAGGGCUAGAGUCGGCCUGC	=			
197-B2-006	29	GCCGGGGUUAGGGCUAGAGUCGGCCGGC	=	=		0.1-0.2
197-B2-006-31a	31	GCCGGGGUUAGGGCUAGAGUCGGCCGGCC		=		
197-B2-006-31b	31	CGCCGGGGUUAGGGCUAGAGUCGGCCGGCG		=		

nucleotídeos terminais na extremidade 5' e na 3' que podem hibridizar uns aos outros (negrito) nt.: nucleotídeos

nucleotídeos os quais podem essencialmente compreender um motivo de ligação de SDF

i.a.: = inativo: = igual afinidade de ligação que 197-B2 ou 191-D5-007

</<<<<: = mais fraca (<), muito mais fraca (<<) ou muitíssimo mais fraca (<<<) afinidade de ligação do que 197-B2 ou 191-D5-007

Comp.: = Clones foram testados como aptâmeros em uma prova de ligação de competição vs. 197-B2 ou 191-D5-007 visto que ambos os clones têm a afinidade de ligação idêntica a SDF-1

TAX: = Clones foram testados como Spiegelmeros em uma prova de quimiotaxia *in vitro* de cultura celular

FIG. 8

Ácidos Nucleícos de Ligação de SDF-1 Adicionais

Nome	nt.	Seqüência: 5' - 3'	PD K _b [nM]
194 - A2 - 001	48	CGUGGUCCGUUGUGUCAGGUCUAUUCGCCCCCGGUGCAGGGCAUCCGCG	12.0
196 - B12 - 003	49	GCAGUGUGACGCGGACGUGAUAAGGACAGAGCUGAUCCCCGCUCAGGUGAG	7.6
196 - B12 - 004	49	CAACAGCAGUGUGACGCGGACGUGAUAAGGACAGAGCUGAUCCCCGCUCAG	5.3

nucleotídeos terminais na extremidade 5' e 3' que podem hibridizar uns aos outros (negrito) nt.: nucleotídeos

PD.: = Clones foram testados como aptâmeros em uma prova de ligação de pull down

FIG. 9

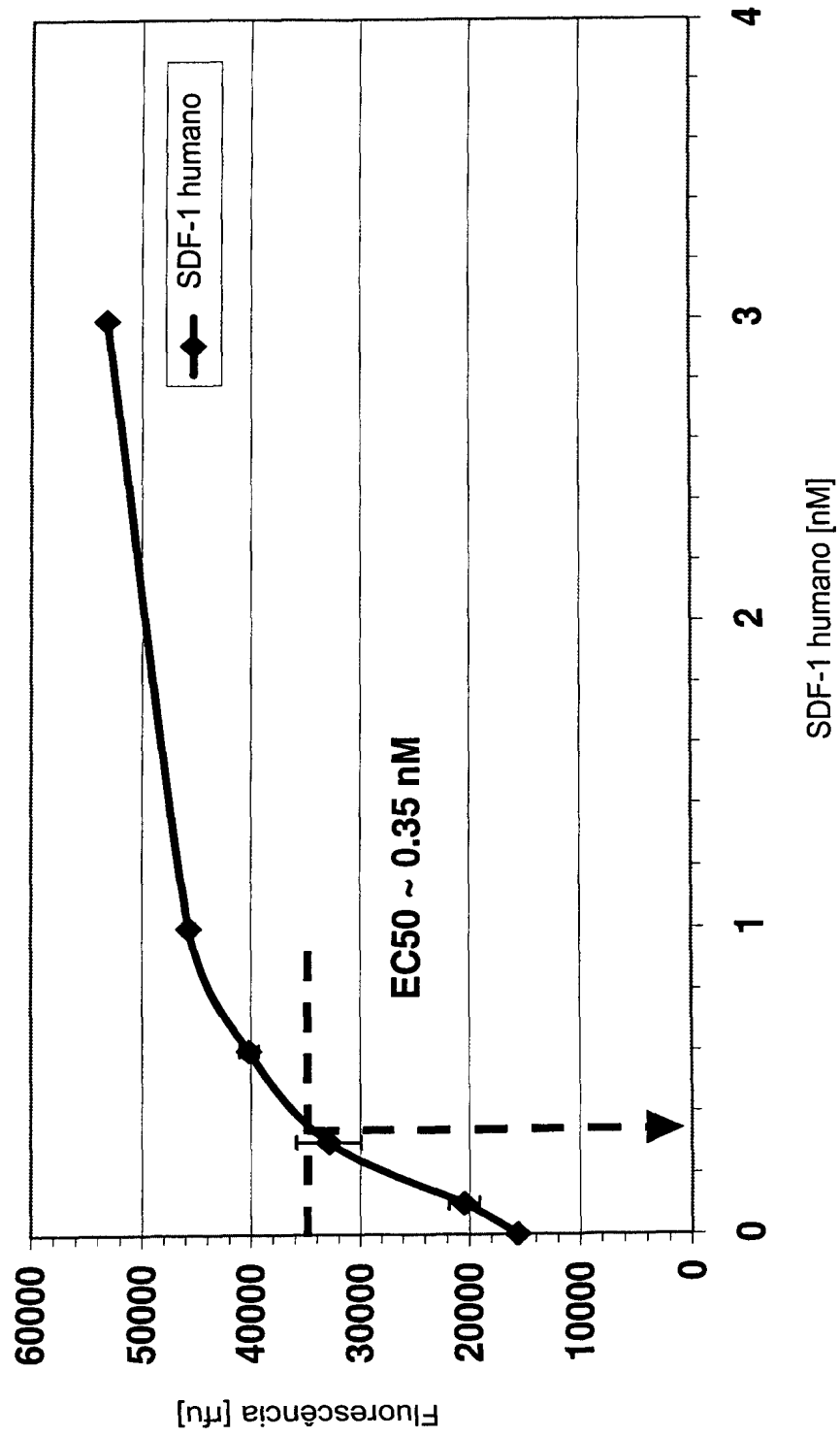


FIG. 10

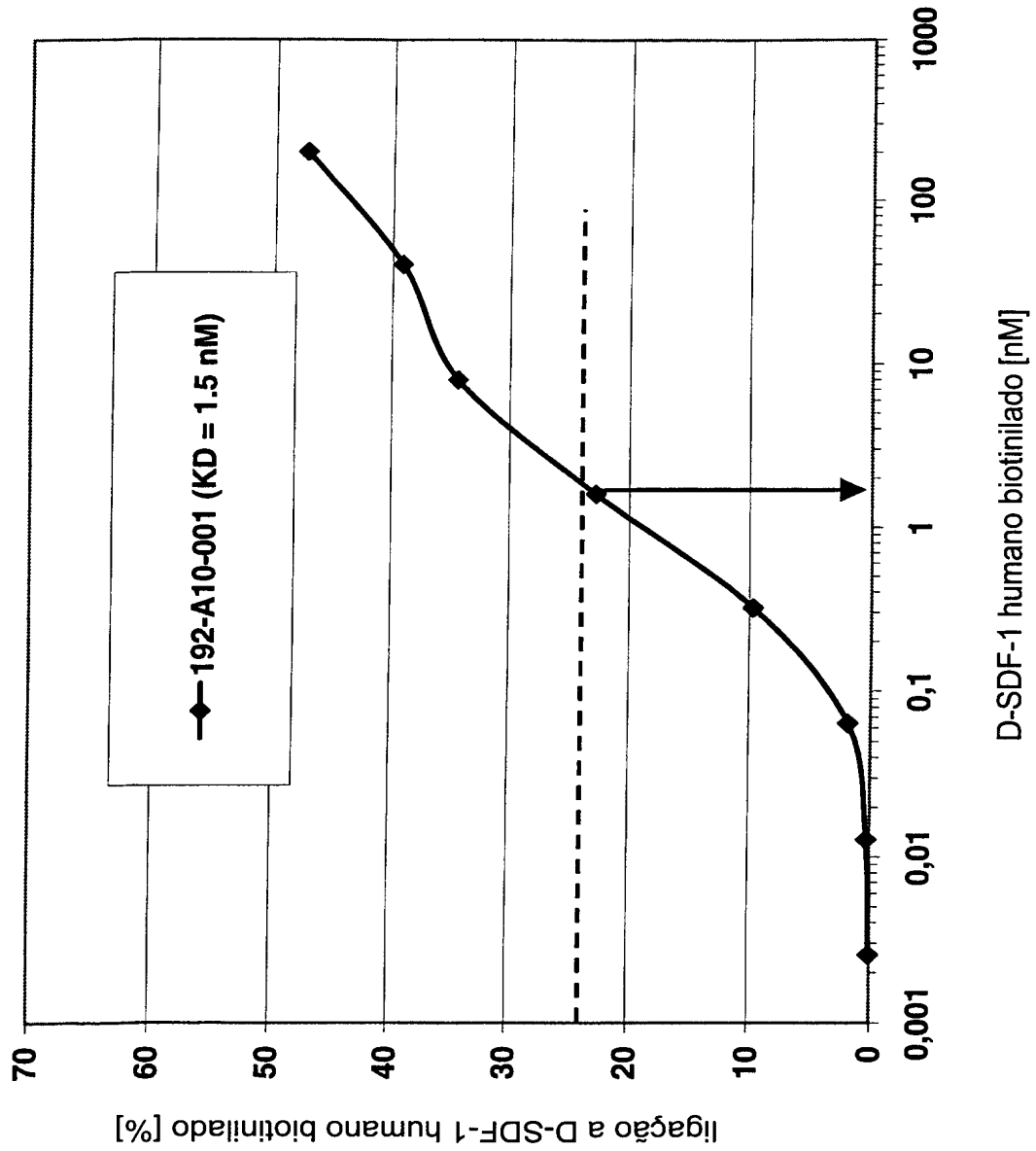


FIG. 11

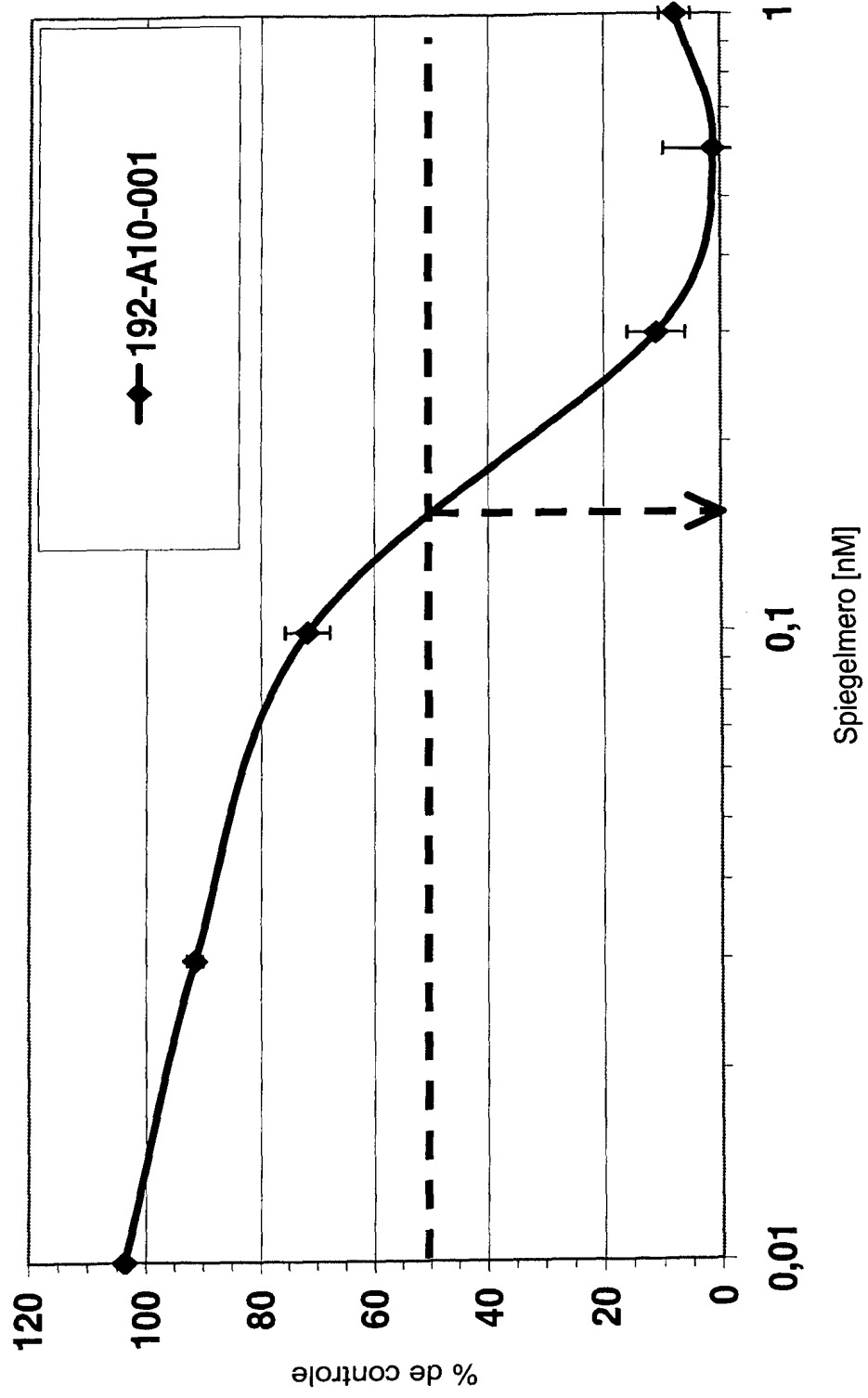
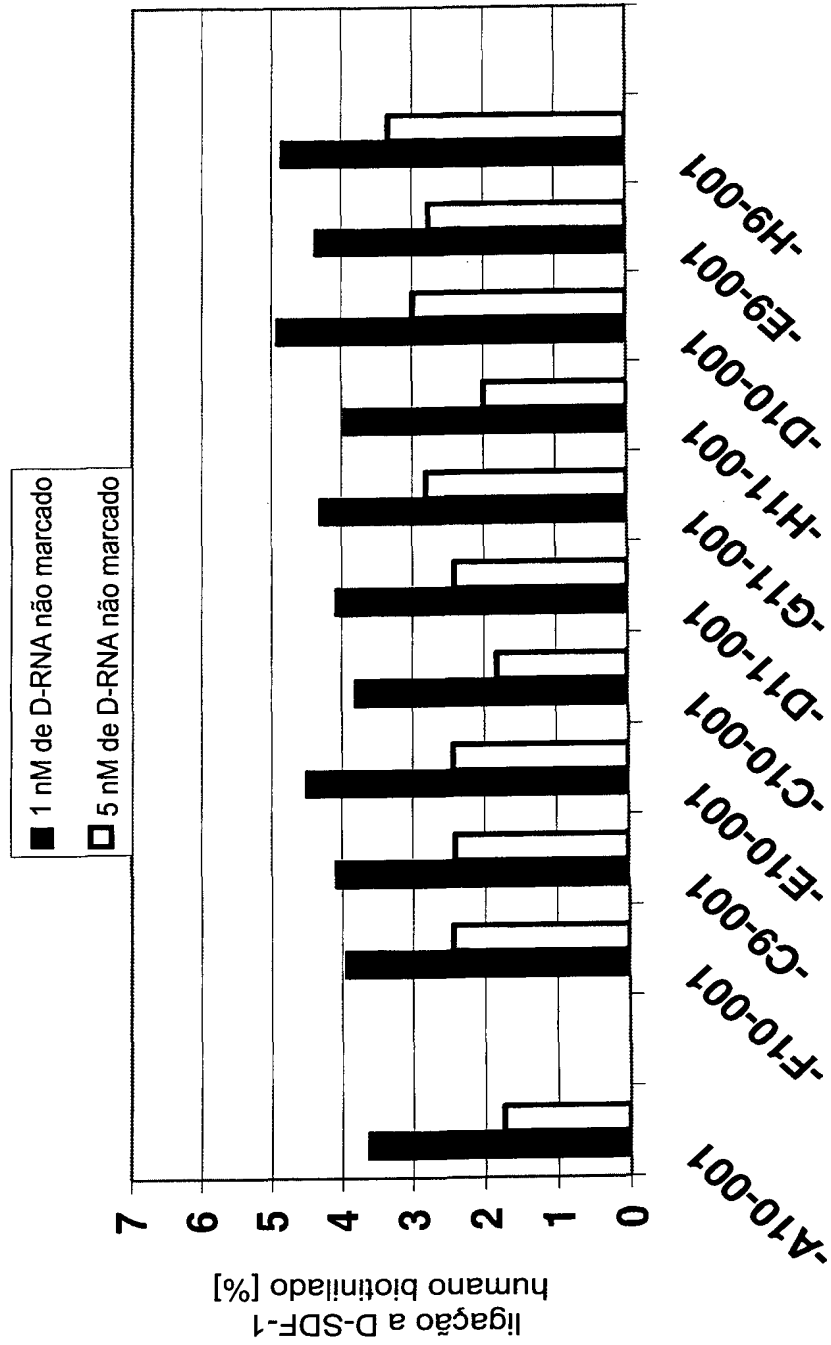


FIG. 12

Classificação competitiva de ácidos nucleicos de ligação de SDF-1 do Tipo A
com 0,08 nM de aptâmero marcado 192-A10-001 como referência



ácidos nucleicos de ligação de SDF-1 do Tipo A, não marcados (192-)

FIG. 13

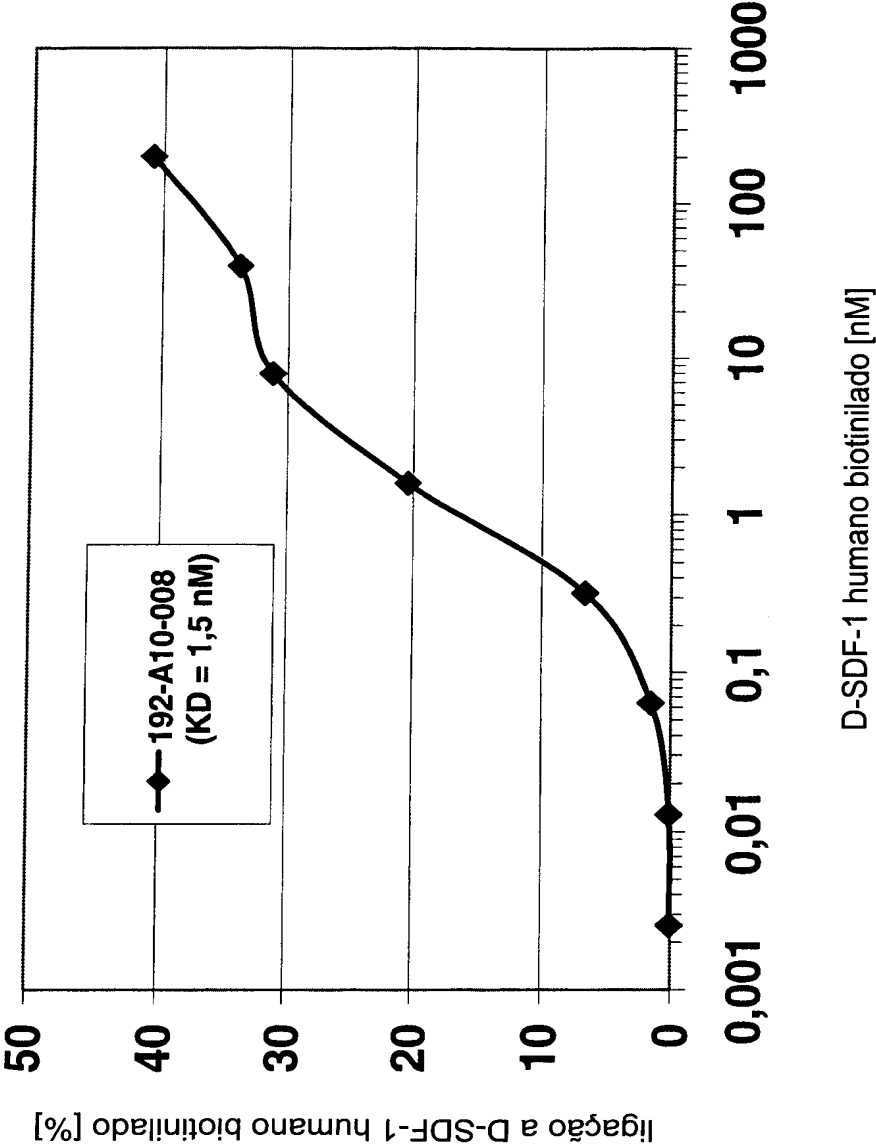
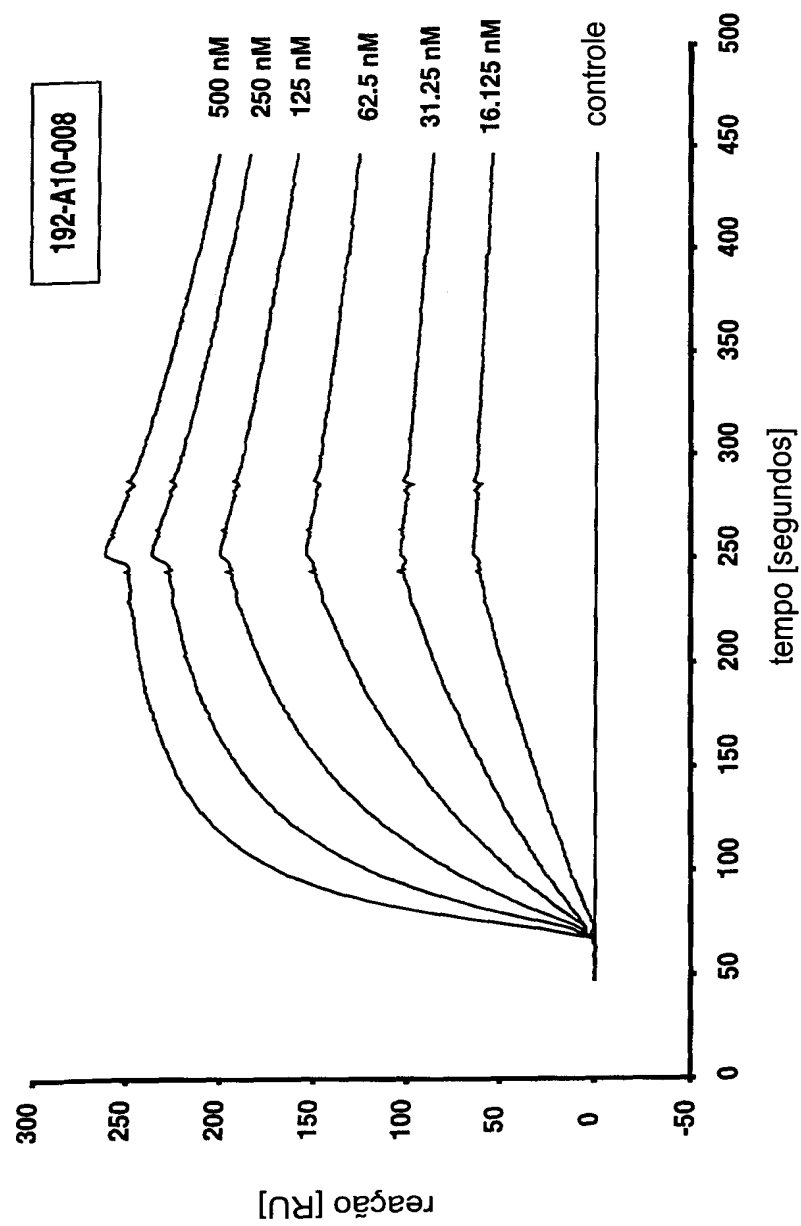


FIG. 14



Spiegelmero	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

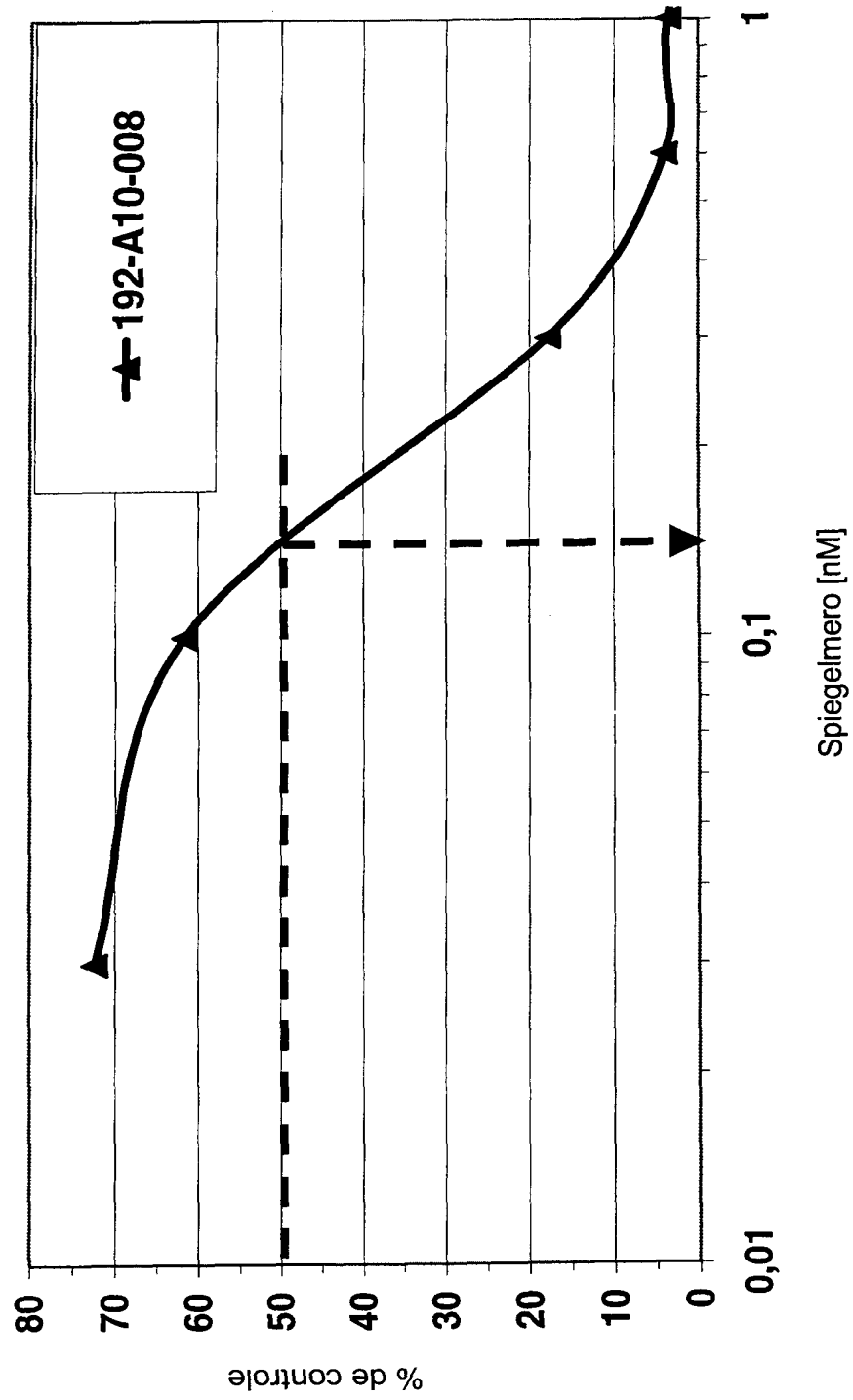


FIG. 16

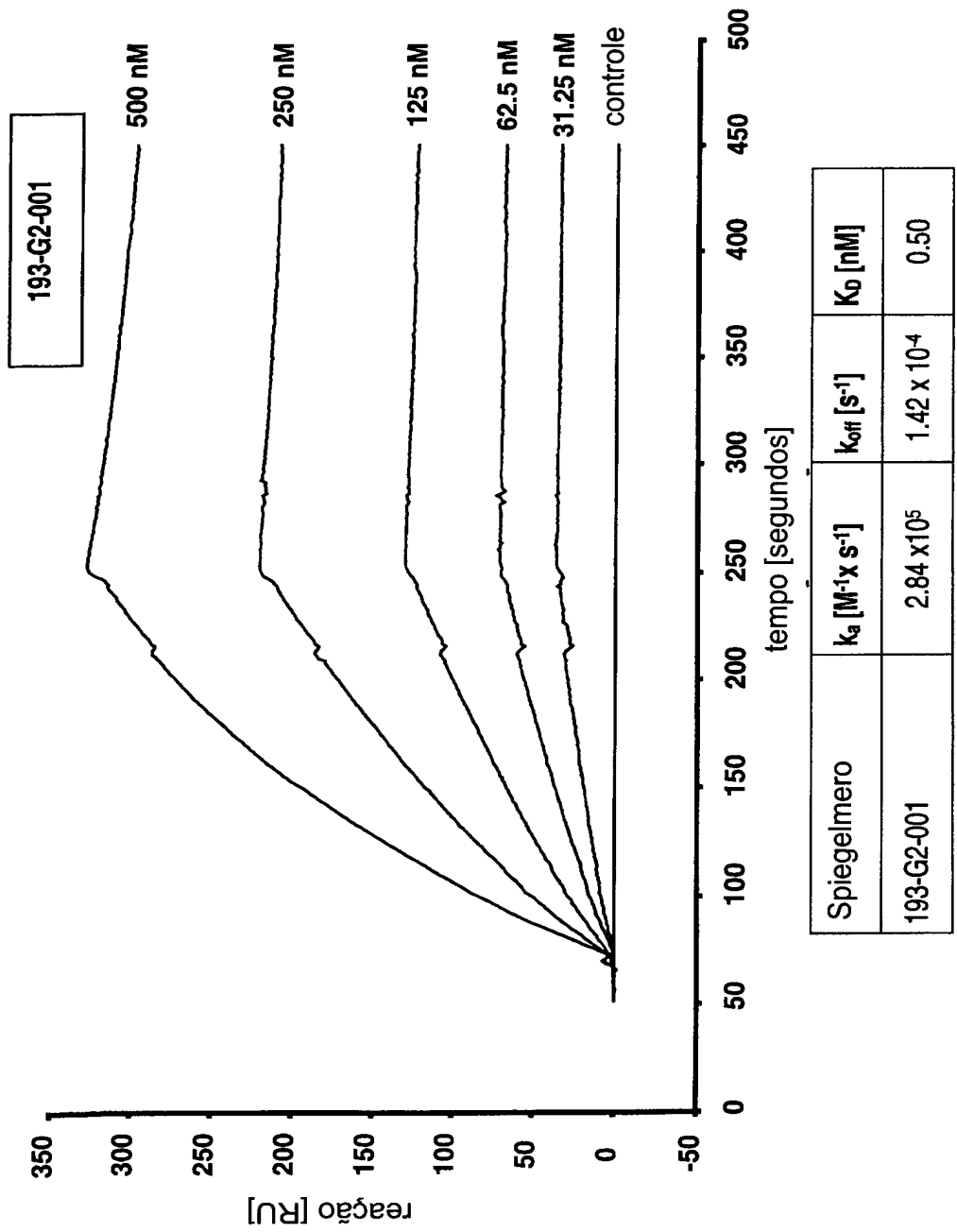


FIG. 17

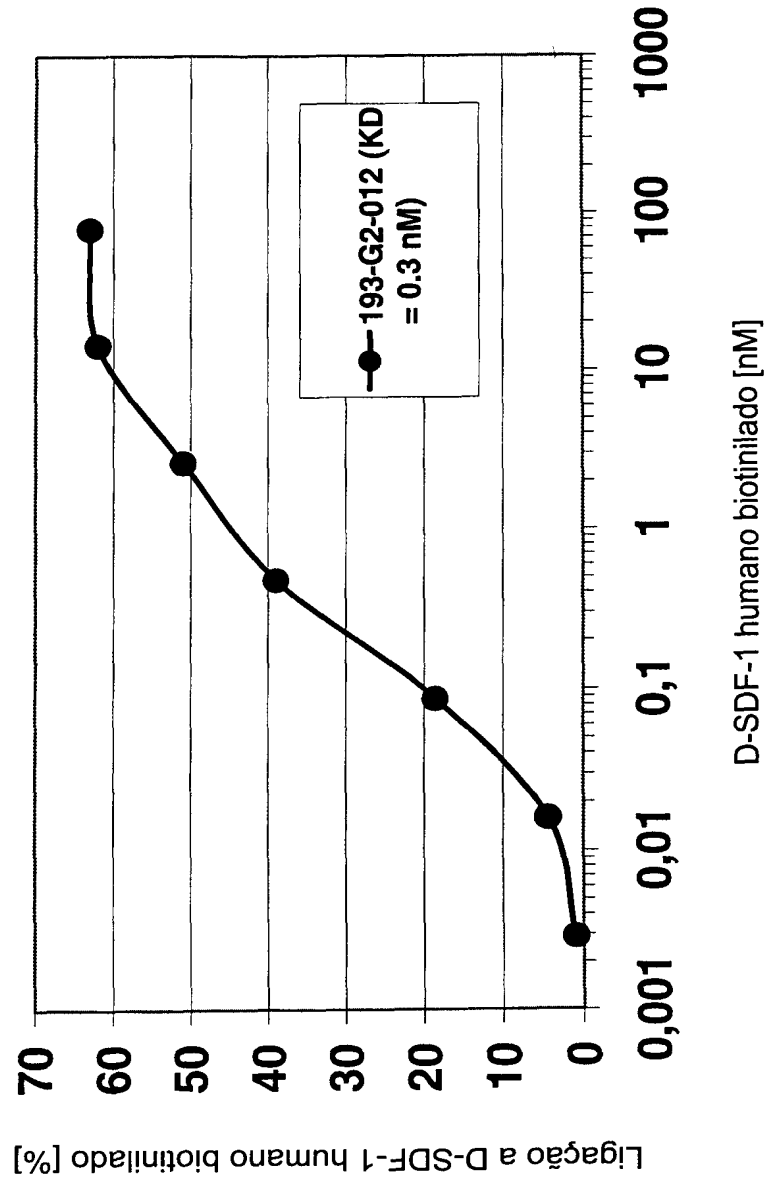


FIG. 18

Classificação competitiva de derivados de
ácido nucléico de ligação de SDF-1 do Tipo C
190-A3-001 com aptâmero marcado
190-A3-001 como referência

Classificação competitiva de derivados
de ácido nucléico de ligação de SDF-1
do Tipo C 191-D5-001 com aptâmero
marcado 191-D5-001 como referência

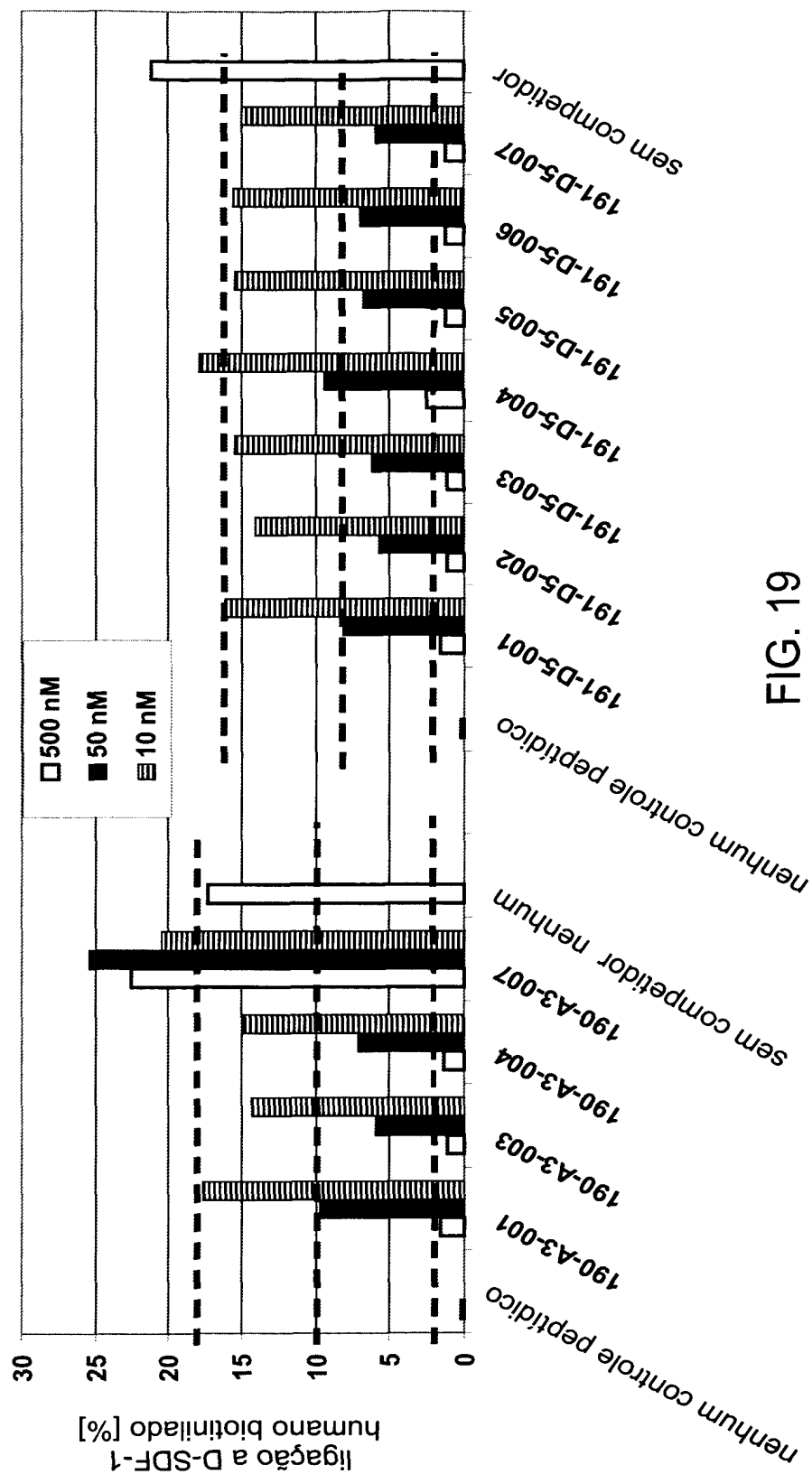


FIG. 19

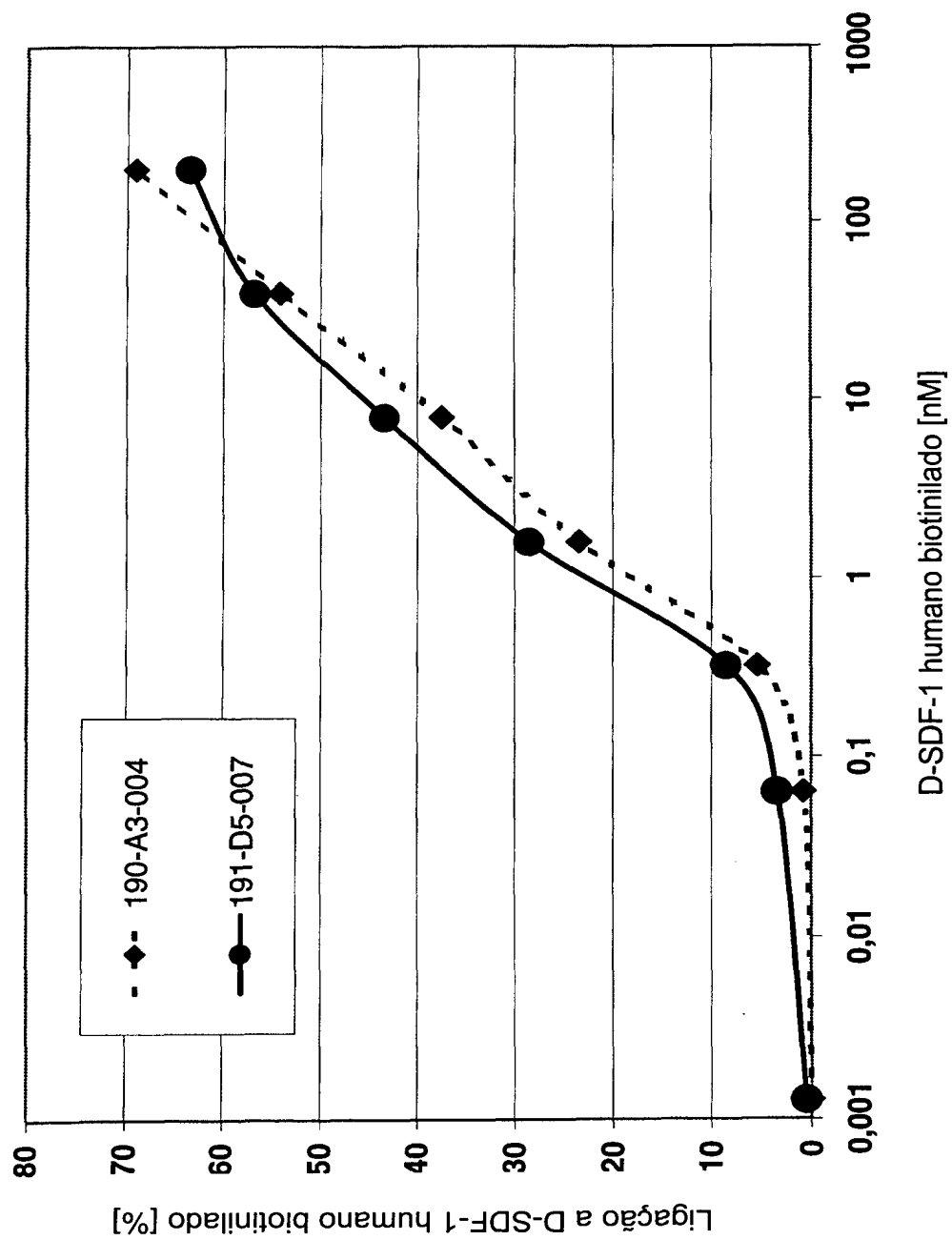
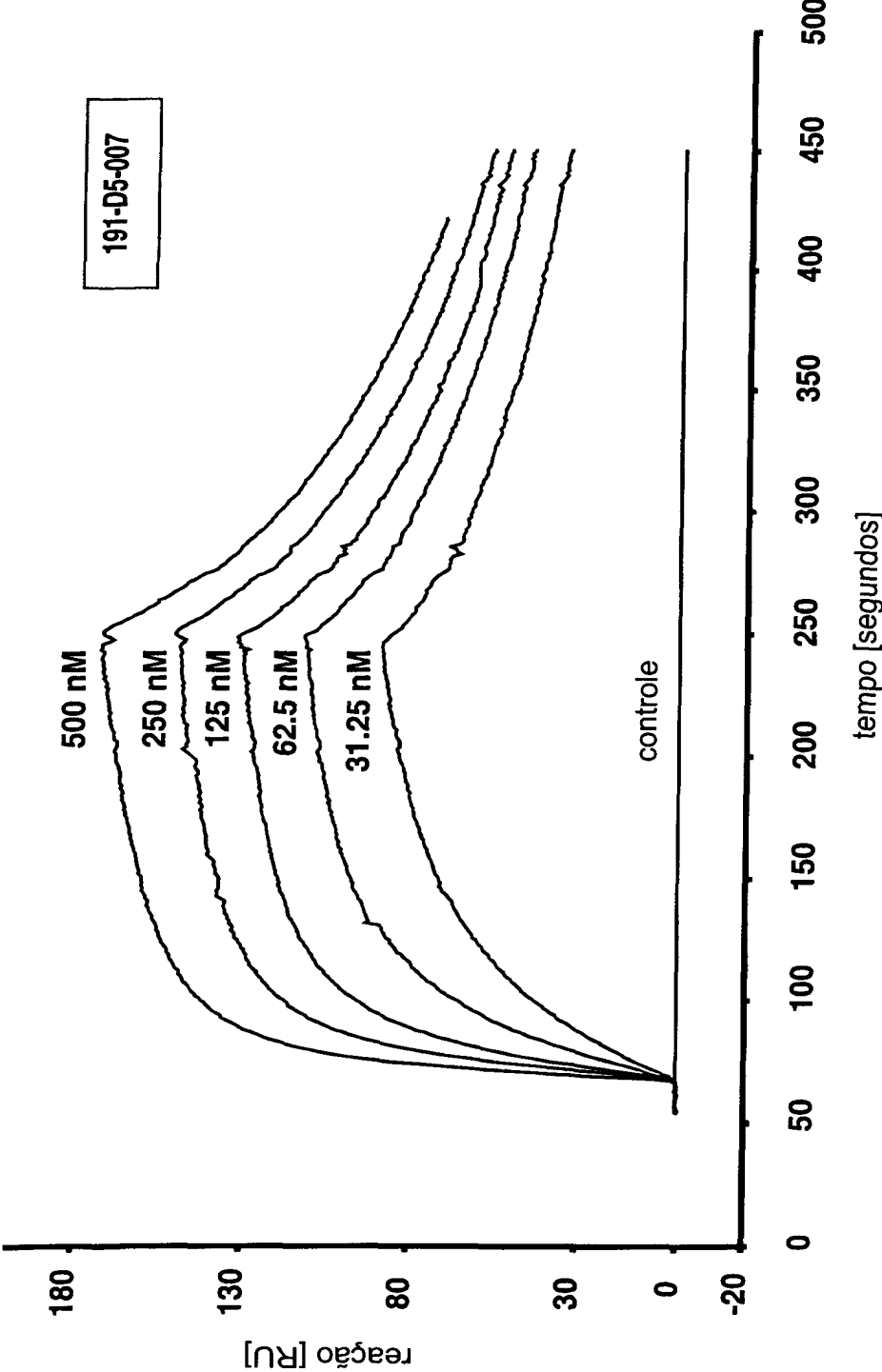


FIG. 20



Spiegelmero	k_a [$M^{-1} \times s^{-1}$]	k_{off} [s^{-1}]	K_D [nM]
191-D5-007	2.68×10^6	2.02×10^{-3}	0.75

FIG. 21

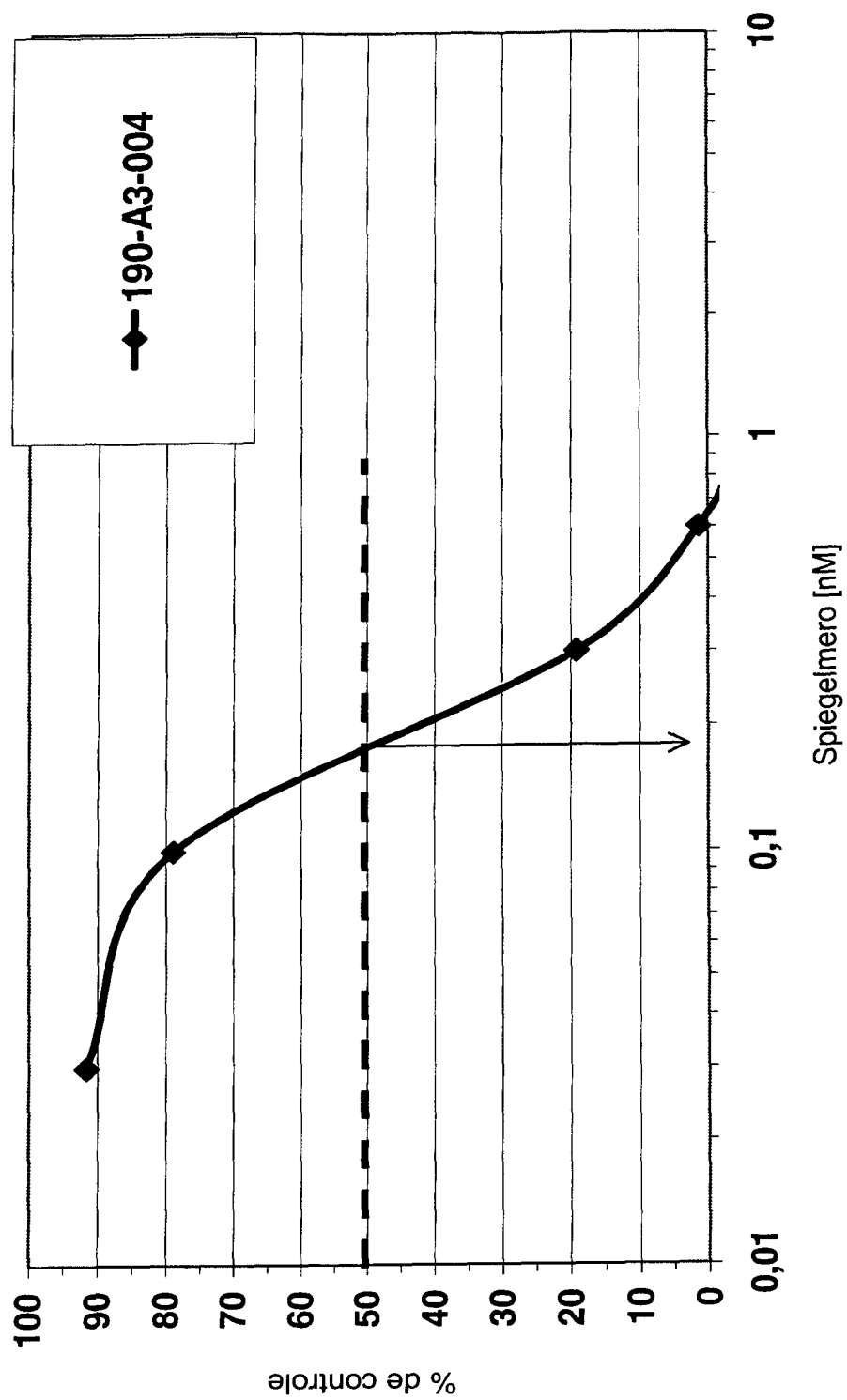


FIG. 22

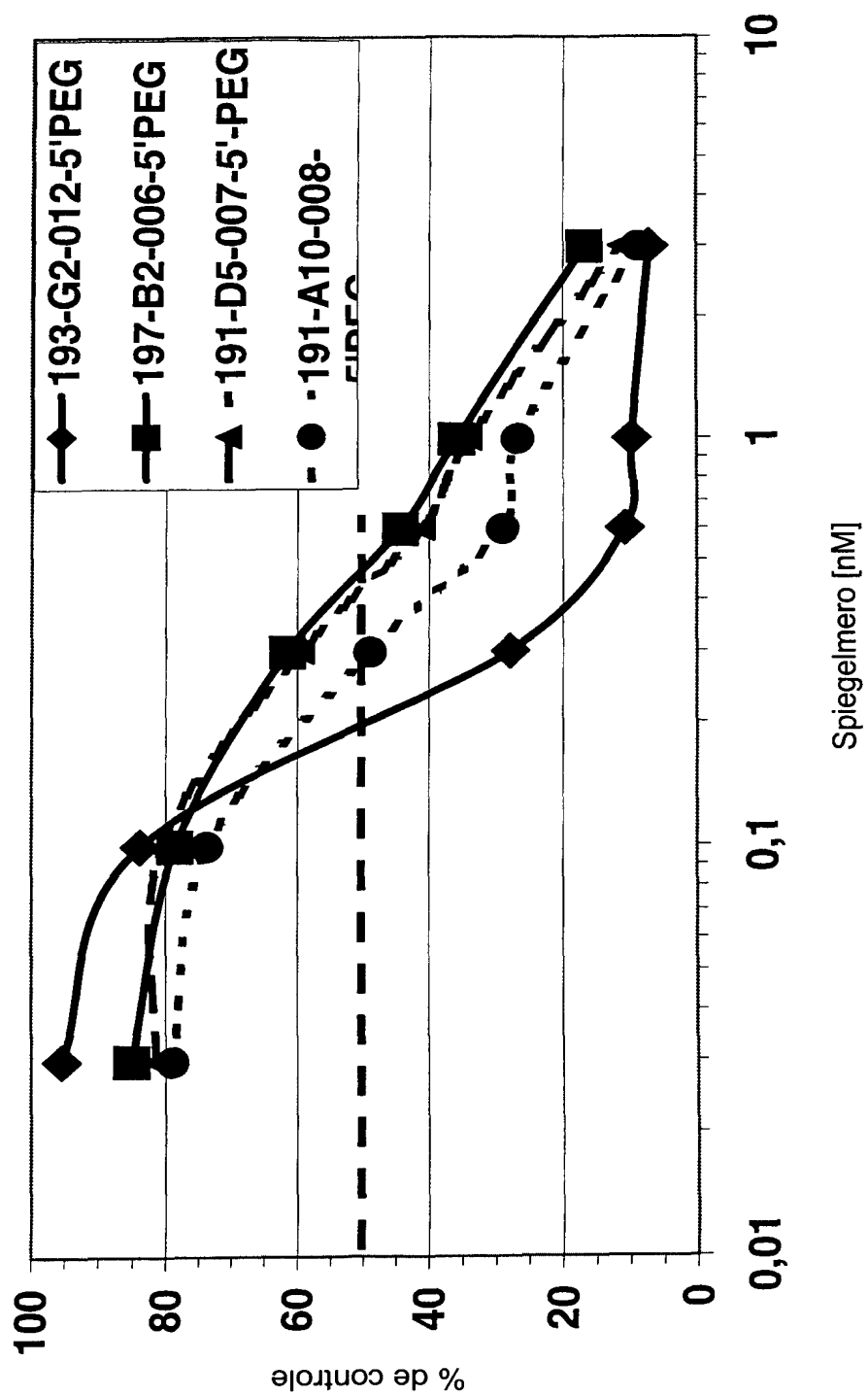


FIG. 23A

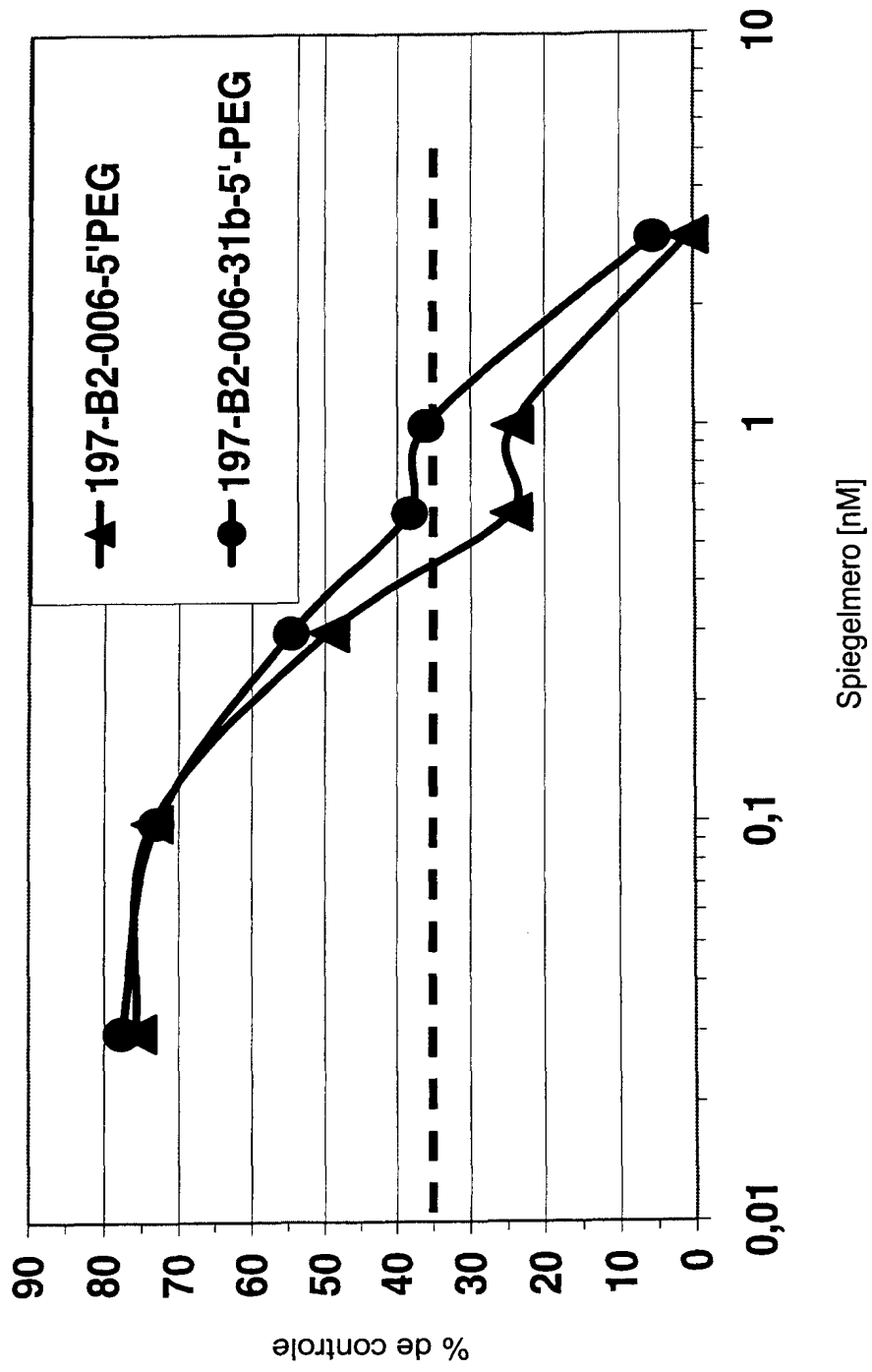
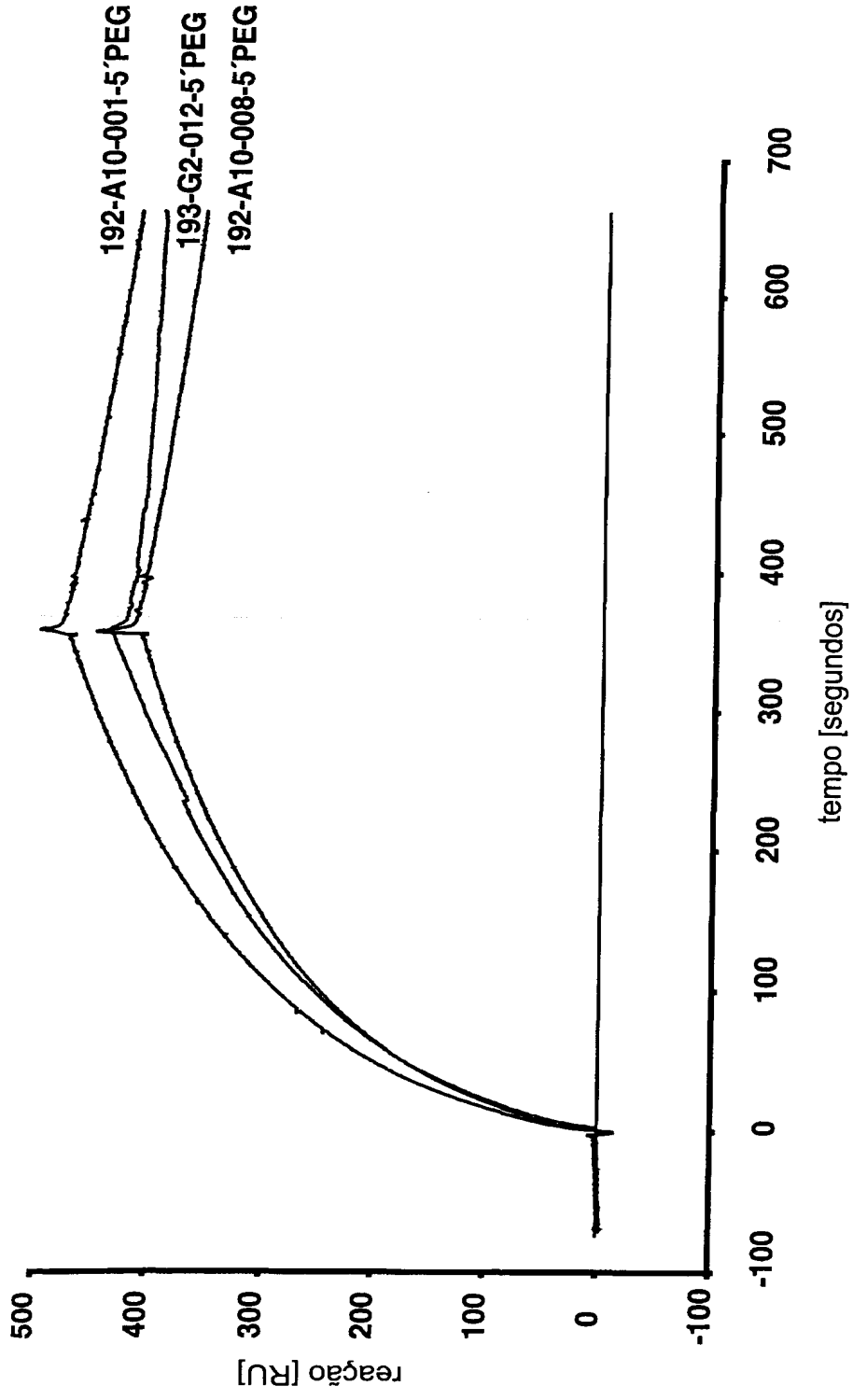
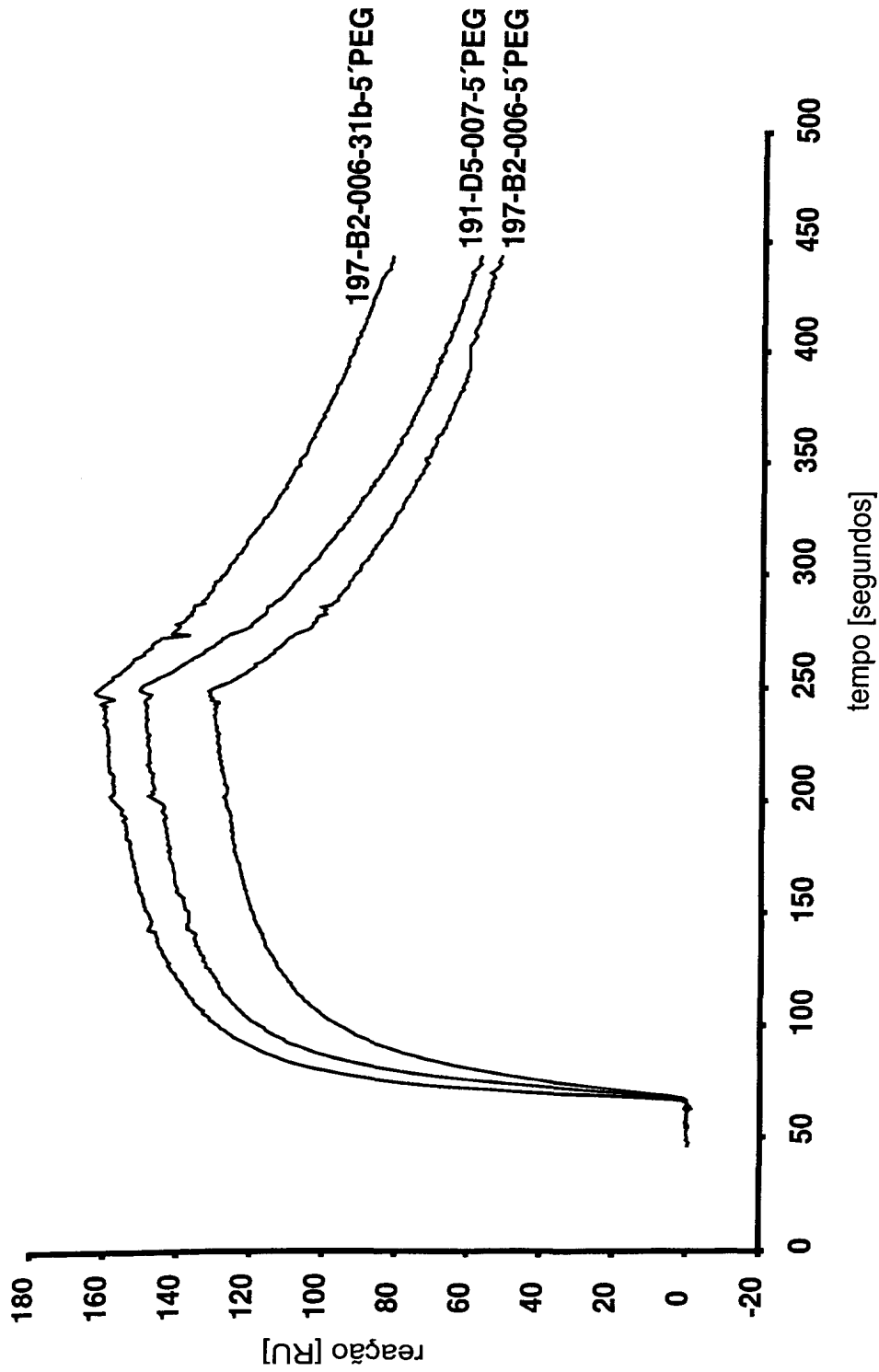


FIG. 23B



Spiegelmero	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. 24A



Spiegelmero	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
197-B2-006-5'PEG	9.05×10^5	5.73×10^{-3}	6.3
197-B2-006-31b-5'PEG	1.47×10^6	4.39×10^{-3}	3.0
	1.96×10^6	3.02×10^{-3}	1.54

FIG. 24B

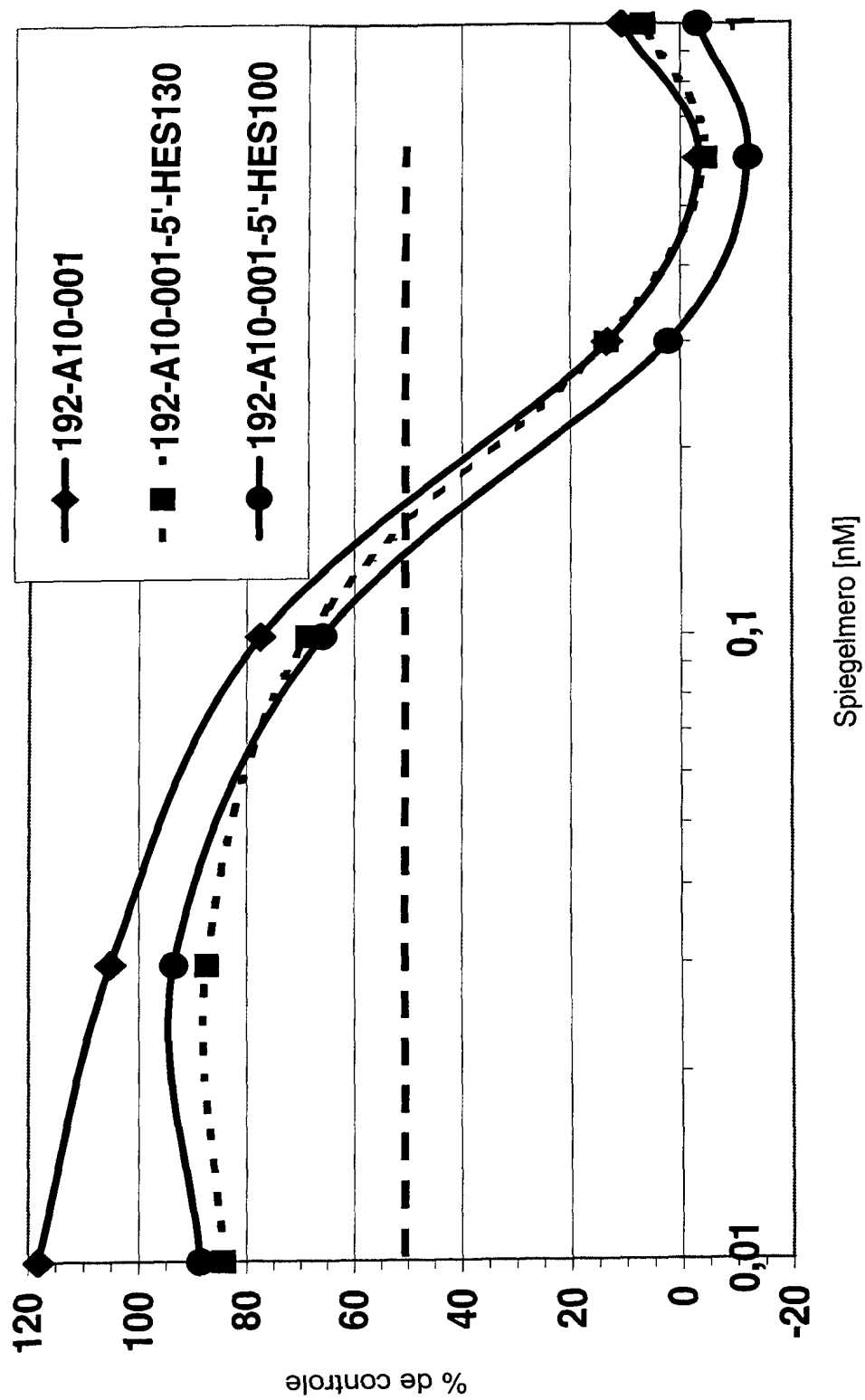
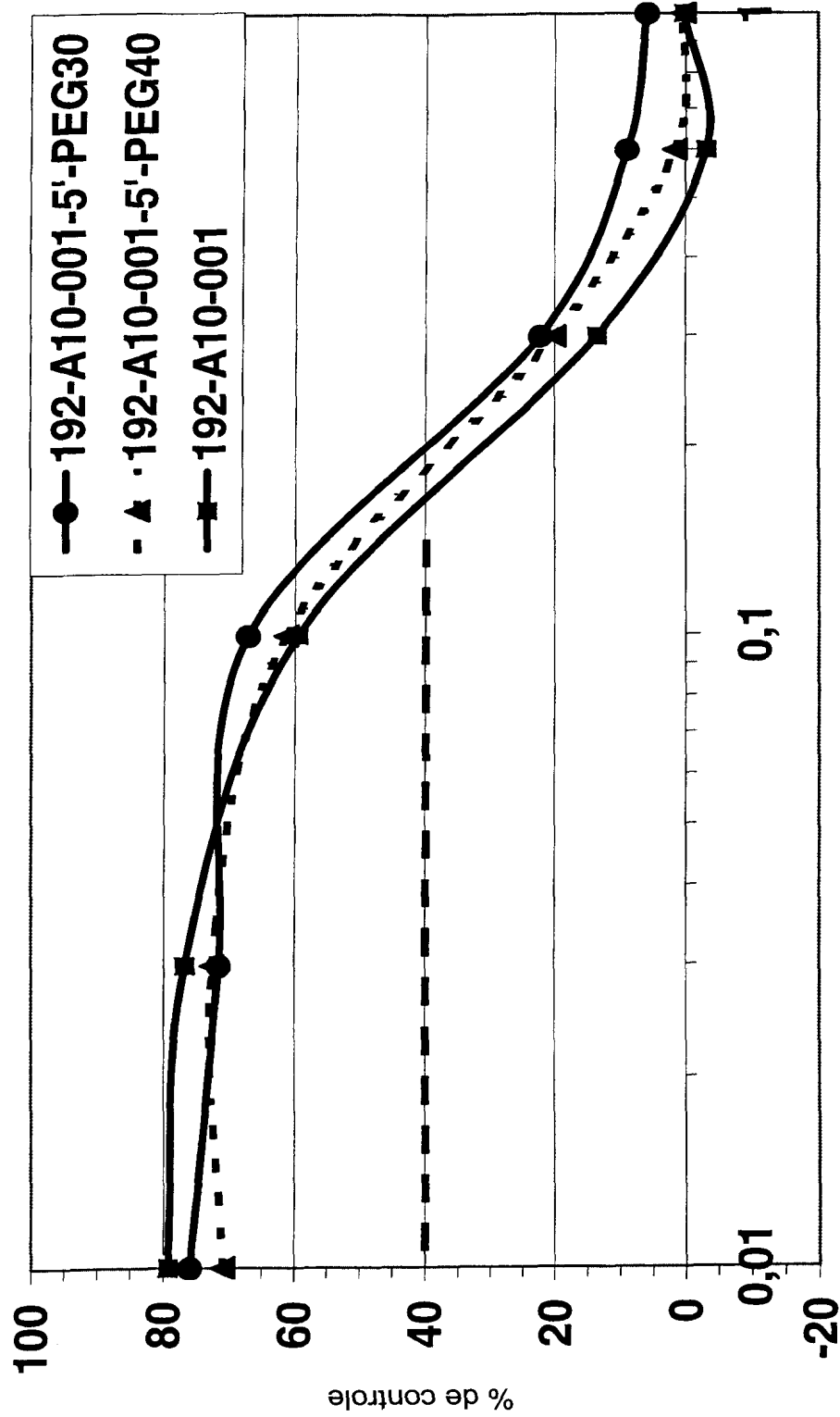


FIG. 25A



Spiegelmero [nM]

FIG. 25B

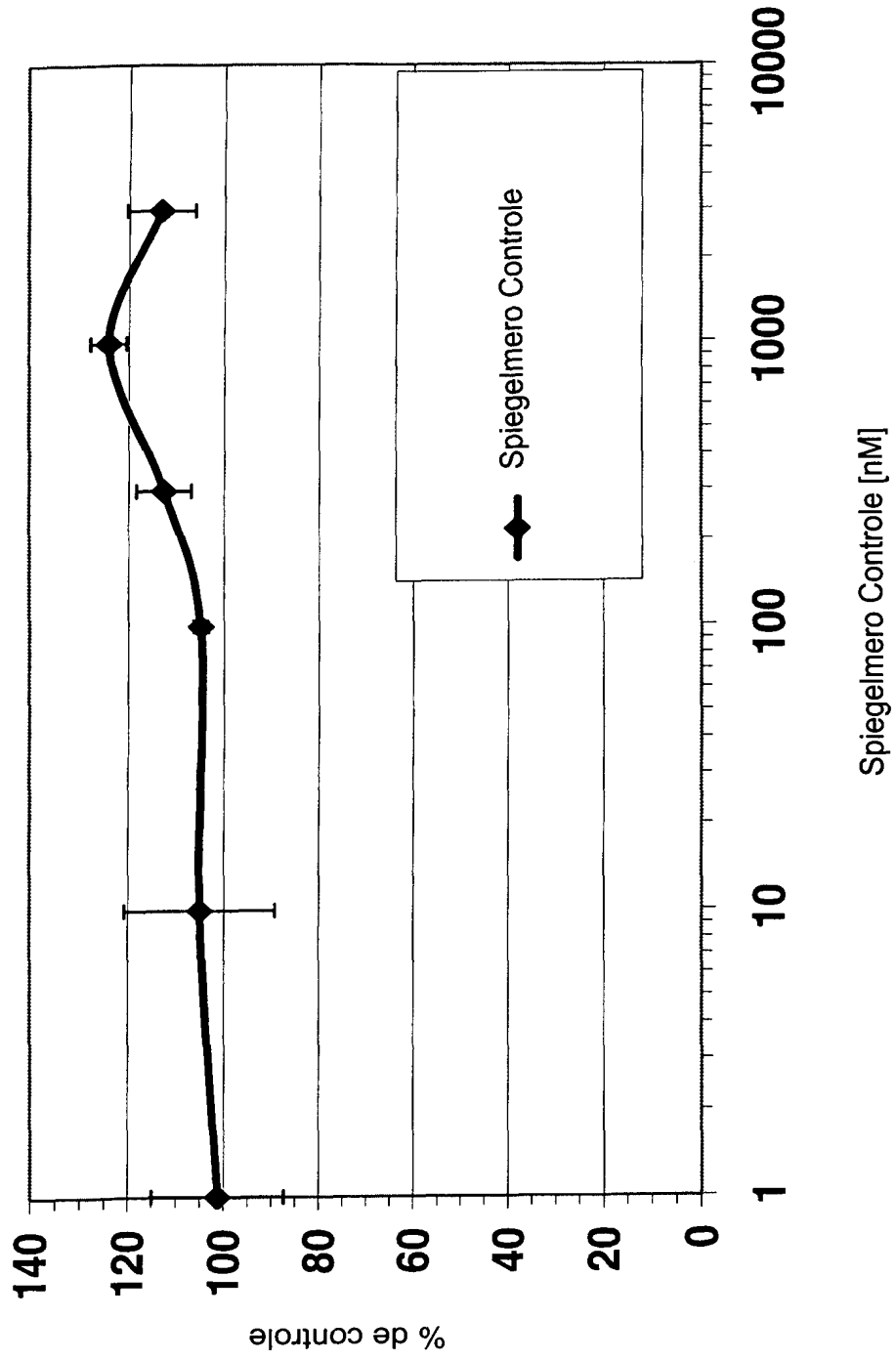


FIG. 26

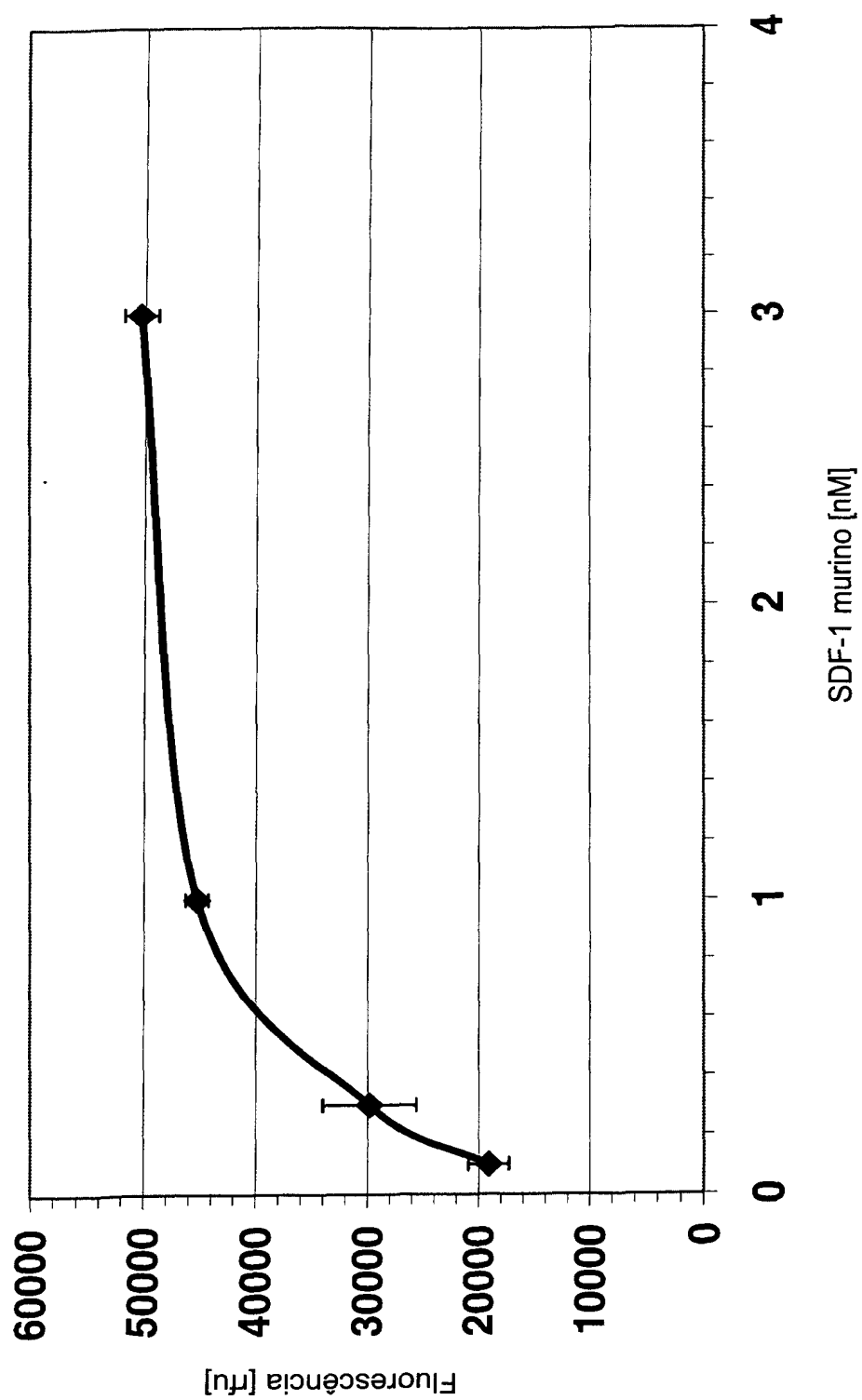


FIG. 27

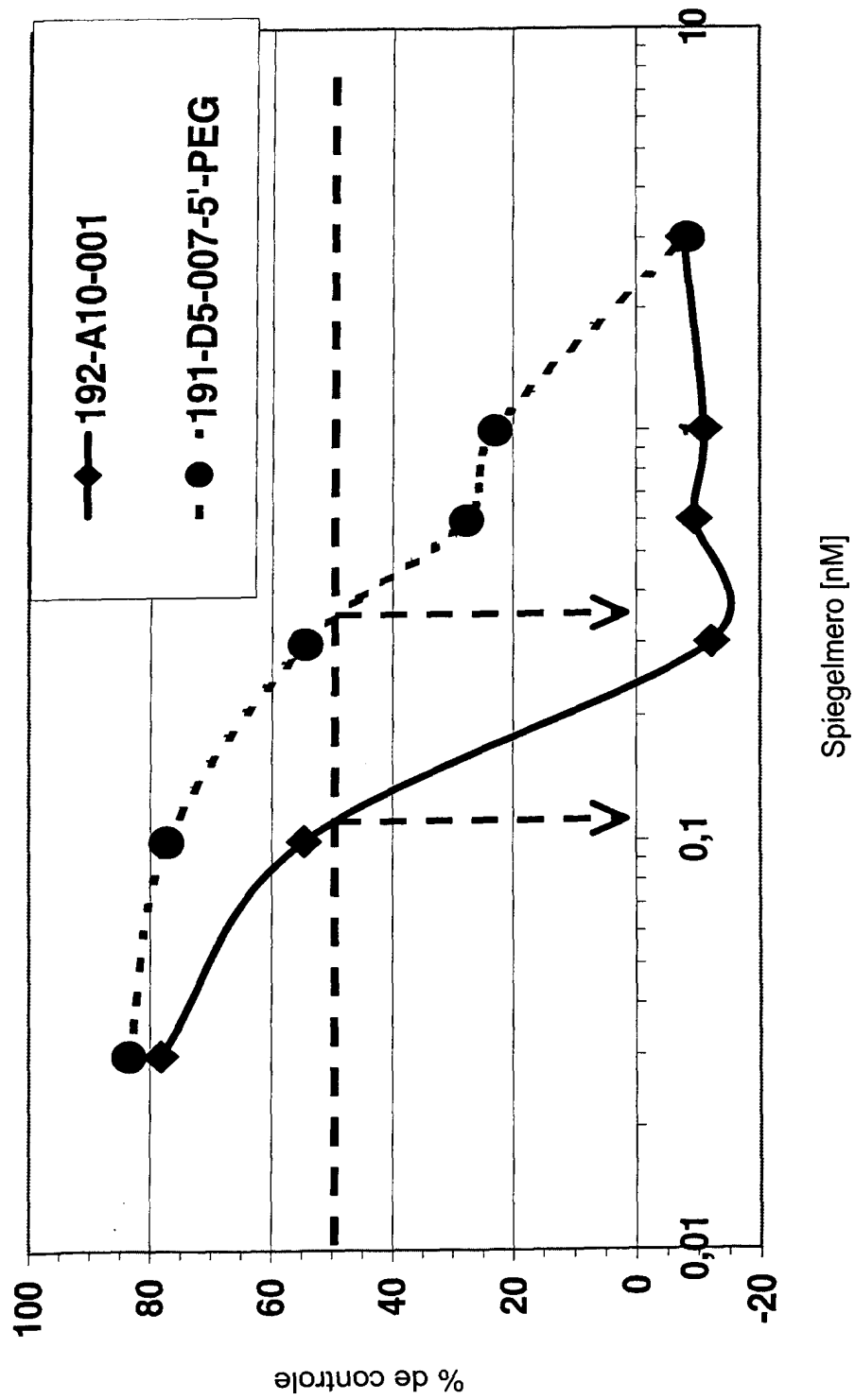


FIG. 28

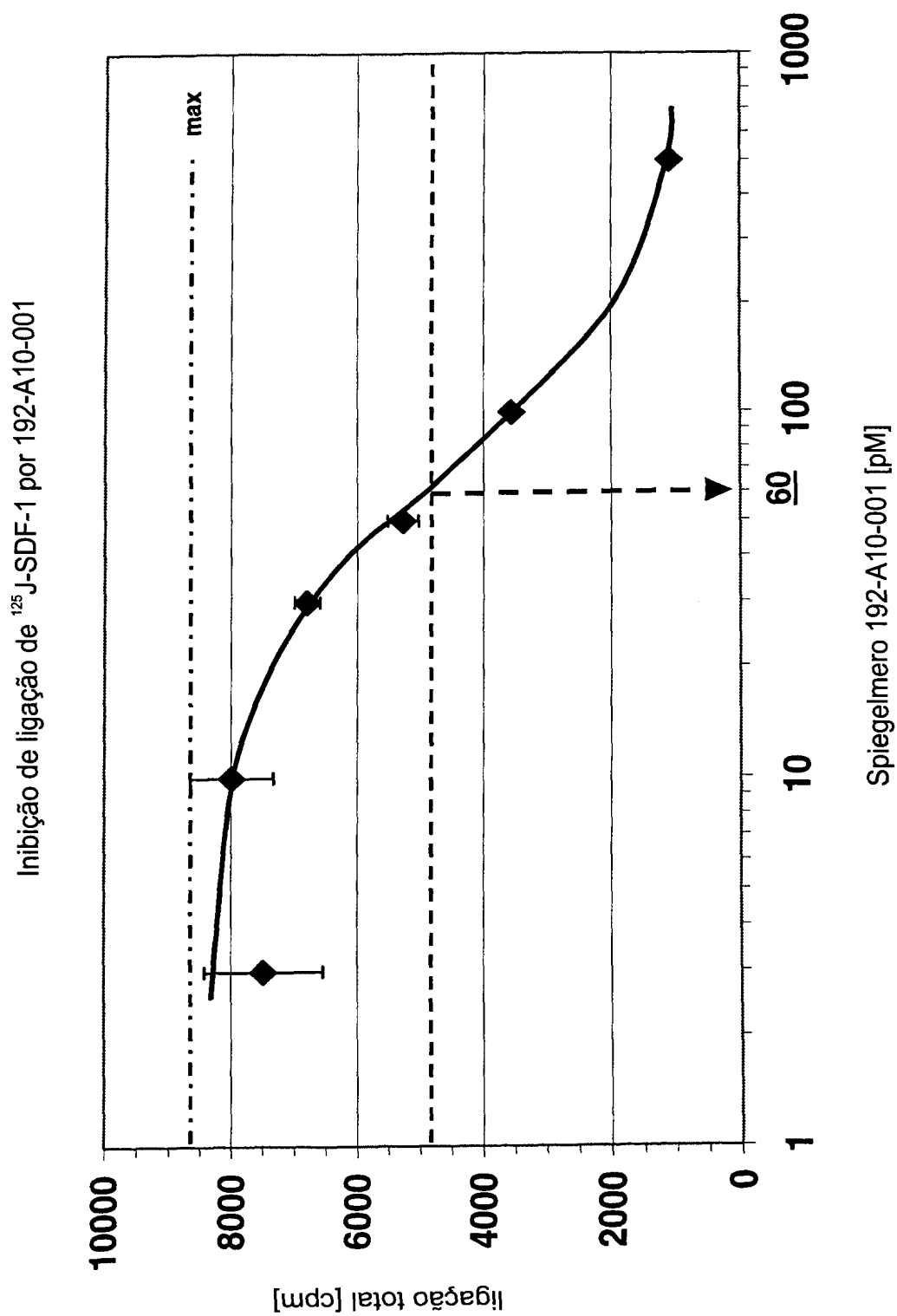
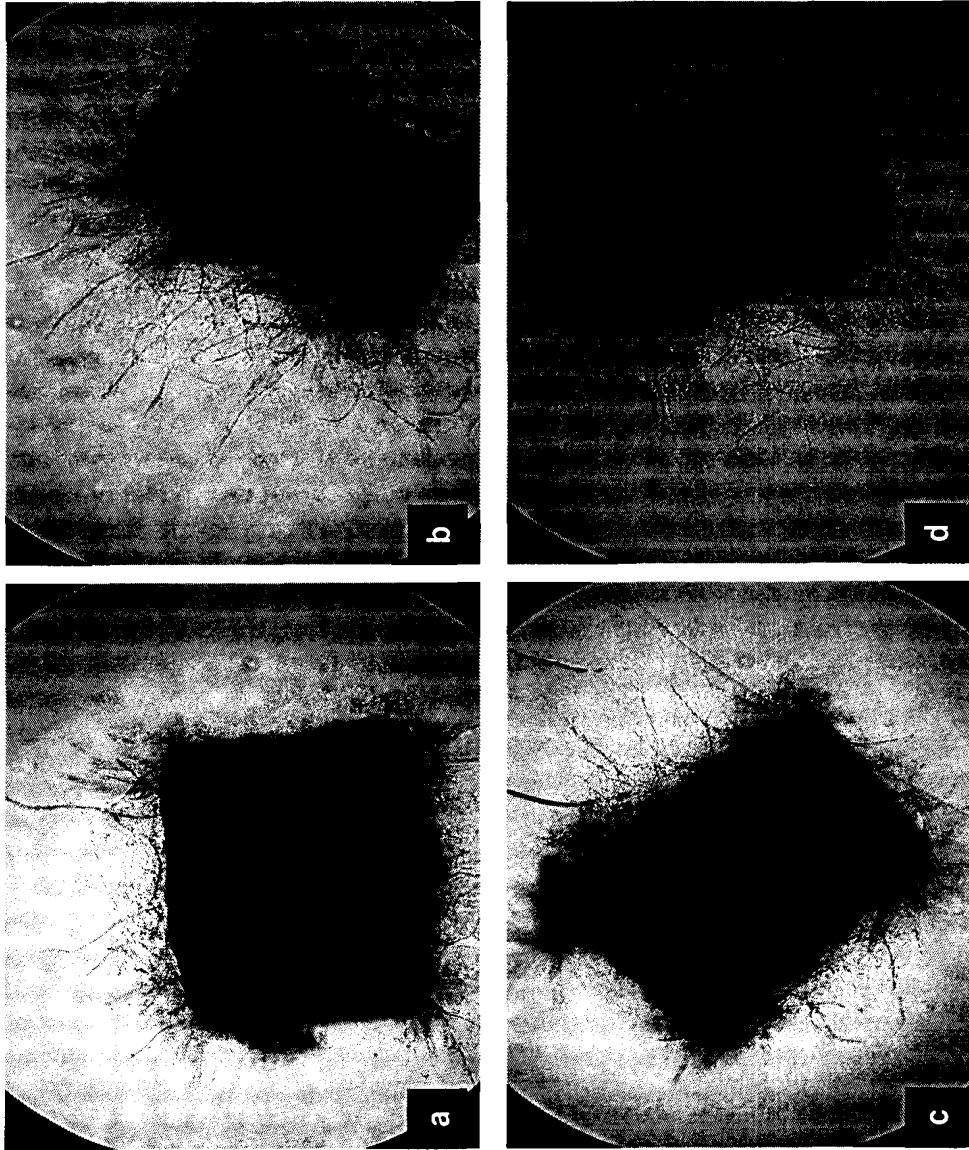


FIG. 29

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 uma prova de germinação do anel aórtico. Anéis de aorta de rato foram embutidos em matriz de colágeno e incubados por 6 dias com SDF-1 com ou sem Spiegelmeros. A: controle; b: 10 nM de SDF-1; c: 10 nM de SDF-1 + 1 μ M de 193-G2-012-5'-PEG; d: 10 nM de SDF-1 + 1 μ M de Spiegelmero Controle PEGuilado

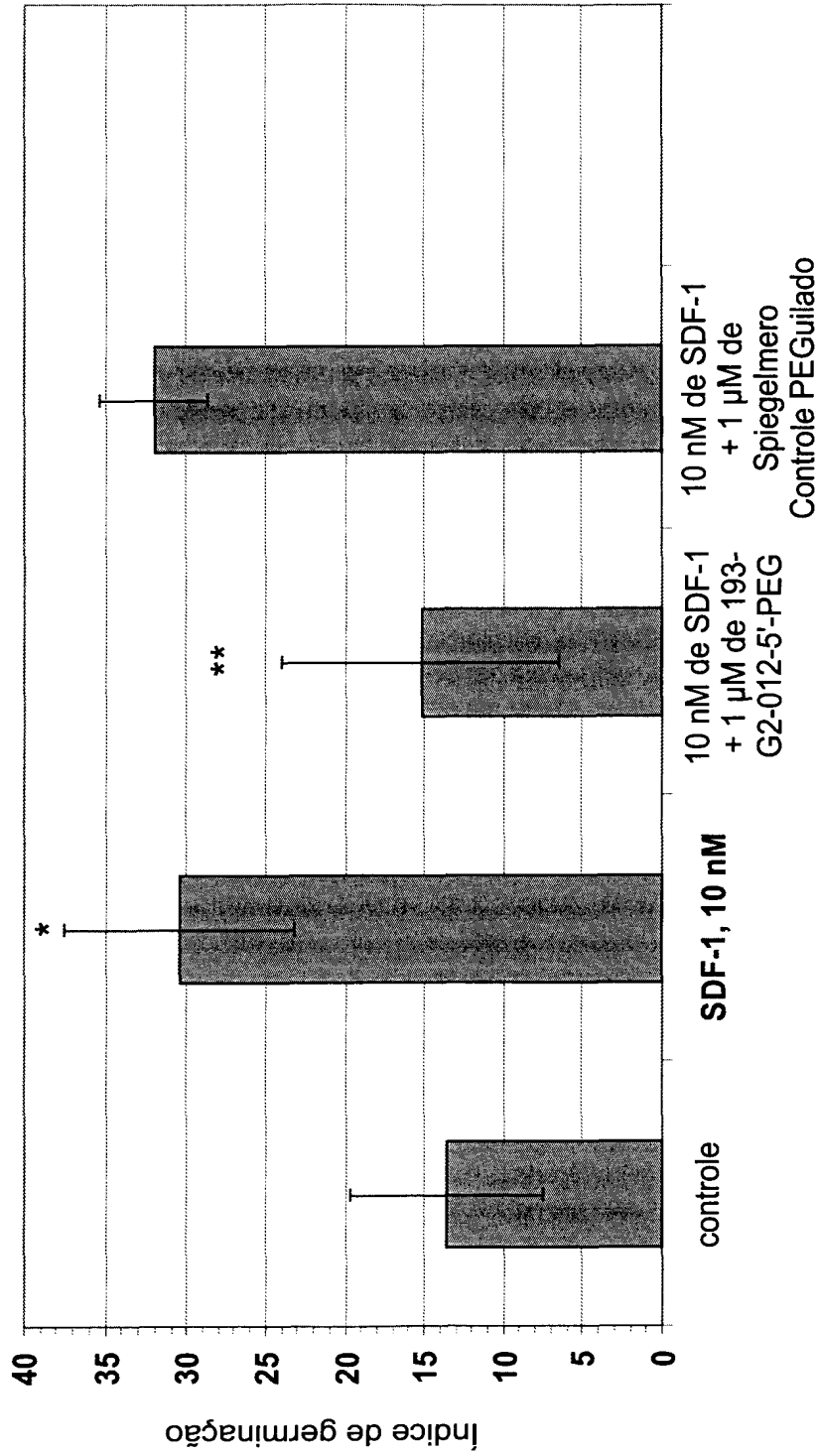


FIG. 32

Germinação induzida por SDF-1 e o bloqueio da mesma por Spiegelmeros em uma prova de germinação do anel aórtico. Anéis de aorta de rato foram embutidos em matriz de colágeno e incubados por 6 dias com SDF-1 com ou sem Spiegelmeros. Os índices de germinação são mostrados como média $\pm$ desvio padrão para 5 anéis por condição. *: o valor para SDF-1 é significativamente diferente do controle (teste de Mann-Whitney; $p = 0,009$); **: o valor para SDF-1 + 193-G2-012-5'-PEG é significativamente diferente daquele para SDF-1 (teste de Mann-Whitney; $p = 0,028$).

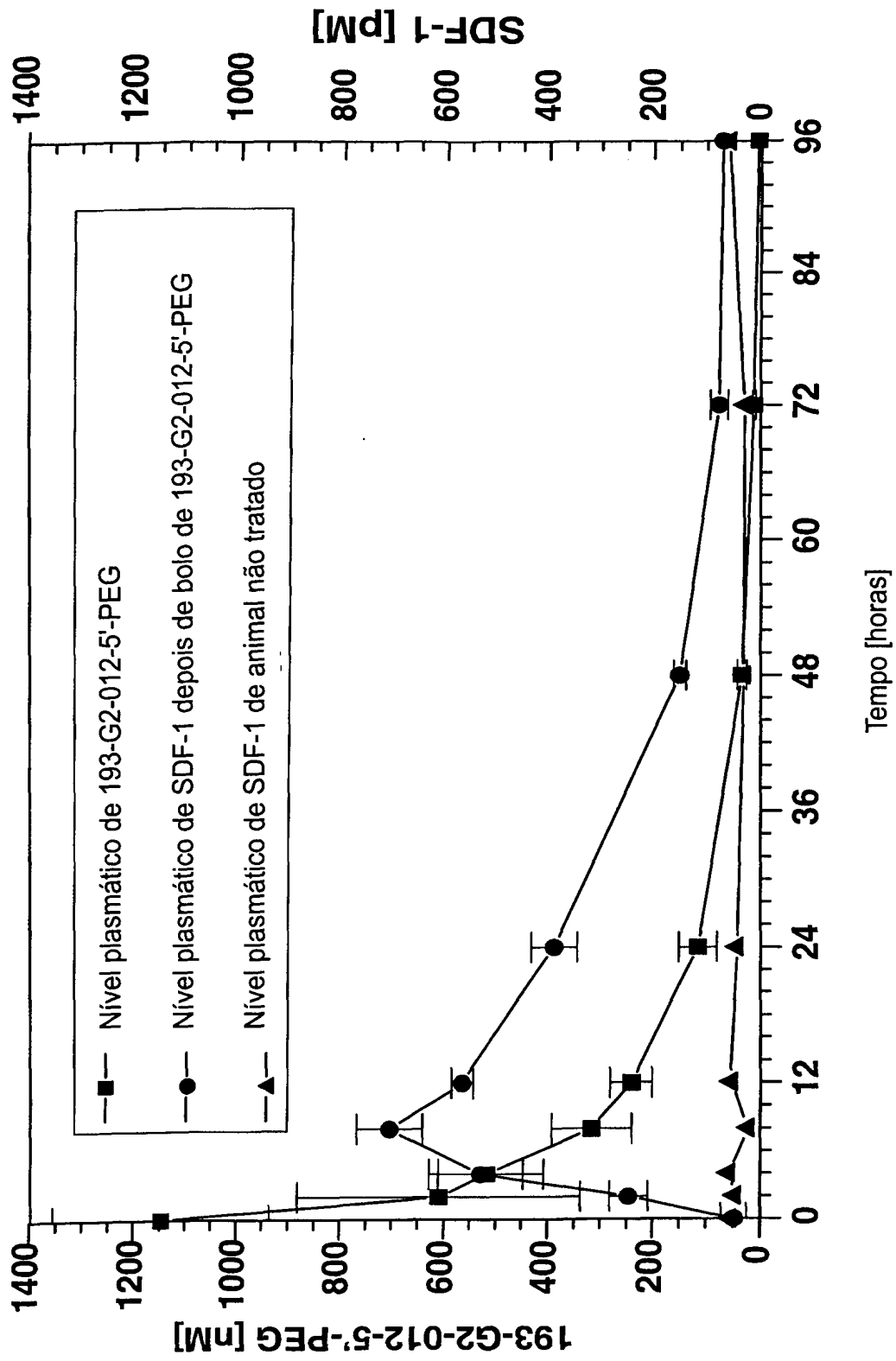


FIG. 33

RESUMO

Patente de Invenção: "**ÁCIDOS NUCLÉICOS LIGANDO A SDF-1**".

5 A presente invenção se refere a uma molécula de ácido nucléi-
co, preferencialmente ligando a SDF-1, selecionada entre o grupo compre-
endendo moléculas de ácido nucléico tipo A, moléculas de ácido nucléico
tipo B, moléculas de ácido nucléico tipo C e moléculas de ácido nucléico
tendo uma seqüência de ácido nucléico de acordo com qualquer de SEQ. ID.
No. 142, SEQ. ID. No. 143 e SEQ. ID. No. 144.