

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 899 917**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/115** (2010.01)

**A61K 31/711** (2006.01)

**G01N 33/53** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.05.2016 PCT/KR2016/004665**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.02.2017 WO17018641**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.05.2016 E 16830674 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.10.2021 EP 3330379**

54 Título: **Aptámero contra el receptor de insulina y la composición farmacéutica que lo contiene**

30 Prioridad:

**27.07.2015 KR 20150106151**

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

**15.03.2022**

73 Titular/es:

**POSCO (50.0%)  
(Goedong-dong), 6261 Donghaean-ro, Nam-gu  
Pohang-si, Gyeongsangbuk-do, 37859, KR y  
POSTECH ACADEMY-INDUSTRY FOUNDATION  
(50.0%)**

72 Inventor/es:

**RYU, SUNG HO;  
YUNN, NA-OH;  
IM, JONG HUN;  
KOH, ARA;  
OH, EUN JU;  
PARK, SEHOON;  
LEE, JIYOUN;  
JANG, SUNG KEY;  
HAN, SEUNGMIN y  
KIM, YOUNG DONG**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

ES 2 899 917 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Aptámero contra el receptor de insulina y la composición farmacéutica que lo contiene

5 [Campo técnico]

La presente divulgación se refiere a un aptámero que se une específicamente a un receptor de insulina y un agonista de insulina que usa la misma o una composición farmacéutica para tratar o diagnosticar enfermedades relacionadas con el receptor de insulina.

10 [Estado del arte]

El receptor de insulina (IR) es un receptor de tirosina quinasa y es un receptor transmembrana que es activado por insulina, IGF-1 o IGF-2. Es una estructura de tetrámero en la que 2 cadenas  $\alpha$  (719 residuos) que comprenden la porción de unión a insulina y 2 cadenas  $\beta$  (620 residuos) que comprenden la porción de penetración de la membrana están conectadas por un enlace S-S. Cuando la insulina se une al receptor, la actividad de la tirosina quinasa en la región intracelular de las cadenas  $\beta$  se activa y se produce la fosforilación de los residuos de tirosina del receptor. Esta autofosforilación provoca la fosforilación de otras proteínas.

20 La activación del receptor de insulina conduce a la absorción de glucosa, y la absorción de glucosa se inhibe cuando la señalización del receptor de insulina disminuye, lo que conduce a diabetes secundaria o complicaciones relacionadas e hiperglucemia, etc.

El aptámero es un material que consta de 4 tipos de ácidos nucleicos y muestra especificidad por la proteína diana de acuerdo con la combinación de la secuencia, a diferencia de un anticuerpo que consiste en un péptido. El aptámero específico para la proteína diana se produce en un tubo de ensayo a través de SELEX (evolución sistemática de ligandos por enriquecimiento exponencial), y el proceso incluye un proceso para encontrar el aptámero que se une específicamente a una proteína purificada en la combinación aleatoria del grupo del aptámero y amplificándolo mediante PCR. Pegaptanib, un nuevo fármaco representativo del aptámero de ADN monocatenario, es un fármaco contra el cáncer que inhibe la unión del factor de crecimiento epidérmico vascular a un receptor del factor de crecimiento epidérmico vascular, utilizado para el factor de crecimiento epidérmico vascular, y está aprobado por la FDA para uso clínico.

Actualmente, la mayoría de los esfuerzos para identificar aptámeros funcionales se centran en la capacidad inhibidora del aptámero a la diana. En particular, se han desarrollado una variedad de aptámeros inhibidores para el tratamiento de enfermedades que interfieren con la actividad de la molécula diana para aplicaciones clínicas (por ejemplo, Macgen, AS1411). Sin embargo, considerando que las interacciones intermoleculares están necesariamente acompañadas de cambios estructurales, se cree que será posible la activación de la función de la proteína, si el enlace aptámero-proteína puede inducir un cambio estructural adecuado de la proteína. Por tanto, teóricamente, el aptámero tiene el potencial de actuar como un agonista funcional imitando un enlace específico proteína-proteína. Sin embargo, el desarrollo del aptámero agonista que activa funciones de la diana sigue siendo un problema difícil en la actualidad.

Además, para regular el azúcar en sangre del paciente normalmente se han desarrollado y utilizado muchos tipos de derivados de insulina en estos días, pero la insulina induce la división celular además de la absorción de glucosa, y el cambio de secuencia de aminoácidos introducido en algunos derivados de insulina aumentan la unión al receptor de IGF-1 y la activación. Por tanto, la administración a largo plazo de insulina para el tratamiento de la diabetes puede aumentar la incidencia de cáncer y existe una preocupación continua por los efectos secundarios causados por la insulina, como la aterosclerosis. Además, se ha informado de que existe una correlación significativa entre la administración persistente de insulina y una mayor incidencia de cáncer a través de algunas investigaciones epidemiológicas. Por lo tanto, el desarrollo de un agonista sesgado para el receptor de insulina que no induzca la división celular y solo aumente la absorción de glucosa proporcionará una buena alternativa a la administración de insulina.

Por tanto, existe una demanda para el desarrollo de un aptámero que se una específicamente al receptor de insulina y la tecnología para tratar o diagnosticar la diabetes mediante su uso.

El documento US 2012/083521 A1 se refiere a aptámeros de ácido nucleico que pueden transducir una señal en células mediante el entrecruzamiento de una molécula de la superficie celular, induciendo así una o más actividades biológicas por parte de las células; sirviendo como agonistas.

El documento WO 2004/011680 A1 se refiere a composiciones terapéuticas que incluyen composiciones terapéuticas reguladas de aptámeros que se dice que tienen especificidad por los componentes de la enfermedad de la diabetes, y métodos para administrar estas composiciones terapéuticas.

Yunn et al (2015) Nucleic Acids Res 43 (16): 7688-7701 se relaciona con el uso de SELEX para generar aptámeros para el receptor de insulina (IR) y la identificación de un aptámero agonista llamado IR-A48 que se dice que se une específicamente a IR, pero no al receptor de IGF-1.

5 [Divulgación]

[Problema técnico]

10 La invención actualmente reivindicada es como se define en las reivindicaciones. Para evitar dudas, en la medida en que se mencione en el presente documento la materia que no está comprendida dentro de la invención reivindicada actualmente, se incluye simplemente con fines de referencia.

15 Por consiguiente, un objetivo de la presente divulgación es proporcionar un aptámero para el receptor de insulina, que se une específicamente al receptor de insulina y comprende desoxirribosa uracilo que está sustituido por un grupo funcional hidrófobo en la posición 5' y está modificado.

20 Además, otro objetivo de la presente divulgación es proporcionar una composición para el tratamiento de la diabetes que comprende el aptámero para el receptor de insulina como ingrediente activo, un método para tratar la diabetes que comprende una etapa de administrar una dosis farmacéuticamente eficaz del aptámero para el receptor de insulina a un paciente con diabetes, y un uso para tratar la diabetes.

Además, otro objetivo de la presente divulgación es proporcionar una composición para diagnosticar diabetes que comprende el aptámero para el receptor de insulina como un ingrediente activo, y un uso para diagnosticar diabetes.

25 Además, otro objetivo de la presente divulgación es proporcionar un método para proporcionar información para el diagnóstico de diabetes utilizando el aptámero para el receptor de insulina.

[Solución técnica]

30 Para lograr los objetivos antes mencionados, la presente divulgación proporciona un aptámero para el receptor de insulina, que se une específicamente a un dominio extracelular del receptor de insulina y promueve la fosforilación del receptor de insulina.

35 En la presente descripción, el aptámero para el receptor de insulina significa un aptámero que puede unirse a la insulina con afinidad específica. El receptor de insulina puede derivarse de la proteína receptora de insulina humana, pero sin limitarse a ella.

40 El aptámero para el receptor de insulina puede comprender un nucleótido modificado en el que la posición 5' está sustituida por un grupo funcional hidrófobo. El aptámero consta de 25 a 90, preferiblemente de 27 a 80, más preferiblemente de 27 a 33 bases, y se une específicamente al receptor de insulina. El nucleótido usado para el aptámero por el receptor de insulina de la presente divulgación, excepto el nucleótido modificado, se selecciona del grupo que consiste en A, G, C, T y sus formas desoxi de nucleótidos, a menos que se mencione específicamente.

45 El número de nucleótidos modificados del aptámero para el receptor de insulina puede ser de 5 a 15, preferiblemente de 6 a 8.

50 Preferiblemente, el aptámero puede ser un aptámero para el receptor de insulina que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 en la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1 denominada como IR-A48 y tiene 33 a 80 de nucleótidos secuenciados para ambos lados, o un aptámero para el receptor de insulina que necesariamente comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 7 en la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 6, y además comprende 27 a 79 o 27 a 80 de nucleótidos secuenciados a ambos lados de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 7.

55 Más preferiblemente, el aptámero puede ser un aptámero para el receptor de insulina que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 en la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1 mencionada y consta de 33 a 80 de nucleótidos secuenciados a ambos lados, o un aptámero para el receptor de insulina que necesariamente comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 7 en la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 6, y consta de 27 a 79 o 27 a 80 de nucleótidos.

60 La secuencia de nucleótidos puede ser una en la que la posición 5' del nucleótido del nucleótido comprendido en el aptámero esté sustituida por un grupo funcional hidrófobo, para aumentar la capacidad de unión y la especificidad del aptámero. Por ejemplo, la posición 5' del nucleótido timina de la región variable está sustituida por un grupo funcional hidrófobo y comprende 8 de desoxirribosa uracilo modificada, por ejemplo, 5-[N-(1-naftilmetil)carboxamida]-2'-desoxiuridina (Nap-dU) en la región variable. El grupo funcional hidrófobo puede comprender un grupo naftilo, un grupo bencilo, un grupo pirrol bencilo o triptófano y, más preferiblemente, el grupo funcional hidrófobo es un grupo naftilo.

65

Específicamente, la estructura de tallo-bucle compuesta por 33 nucleótidos puede estar formada por los números 15 a 47 pb de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1 denominada como IR-A48F, y la secuencia de nucleótidos que consiste en los números 15 a 47 de nucleótidos puede ser la SEQ ID NO: 2. Además, la estructura de tallo-bucle compuesta de 27 nucleótidos puede estar formada por los números 26 a 45 de las bases de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 6 denominada como IR-A62F, y la secuencia de nucleótidos que comprende nucleótidos adicionales a ambos lados de la estructura de tallo-bucle compuesta de los números 26 a 45 de los nucleótidos puede ser la SEQ ID NO: 7.

Los presentes inventores verificaron que el aptámero para el receptor de insulina no se une al receptor de IGF-1 (factor de crecimiento similar a la insulina) que tiene una estructura muy similar al receptor de insulina y se une específicamente al receptor de insulina. Específicamente, el aptámero para el receptor de insulina denominado IR-A48 de la presente divulgación puede unirse de manera no competitiva a la insulina en una posición diferente, y la constante de disociación (Kd) cuando se une al receptor de insulina es de 1 nM a 20 nM, preferiblemente de aproximadamente 3,5 a 6,9 nM. El aptámero para el receptor de insulina denominado IR-A62 puede aumentar la unión de la insulina a través de una cooperación positiva con la insulina, y la constante de disociación (Kd) cuando se une al receptor de insulina es de 0,5 nM a 40 nM, preferiblemente de aproximadamente 2,4 a 26,9 nM.

Los presentes inventores desarrollaron el aptámero que se une al receptor de insulina usando el método SELEX, y verificaron que el aptámero desarrollado se une al receptor de insulina para fosforilar el receptor de insulina.

Cuando la insulina se une a un receptor, el residuo de tirosina del receptor se fosforila y la fosforilación del receptor de insulina aumenta la absorción de glucosa regulando el movimiento del transportador de glucosa 4 (GLUT4) en los adipocitos y el músculo a través de la transmisión de señales. La función metabólica de este receptor de insulina está regulada principalmente por la vía IRS-AKT y, además, PI3K juega un papel importante en la fosforilación de AKT en el proceso de transmisión de señales de insulina. Un material inhibidor de PI3K conocido públicamente, LY29400 previene por completo no solo la fosforilación de AKT sino también las funciones celulares inducidas por AKT como la absorción de glucosa.

El aptámero para el receptor de insulina de la presente divulgación promueve la fosforilación del receptor de insulina, y específicamente fosforila Y1150 del receptor de insulina preferentemente, y luego promueve la fosforilación de AKT S473, para captar glucosa al nivel de insulina. Los presentes inventores verificaron que la fosforilación y la absorción de glucosa se inducen a través de PI3K.

La ruta de MAPK es una ruta representativa de transmisión de señales inducida por el receptor de insulina y juega un papel importante en la división celular, y la insulina también es bien conocida por inducir la división celular en algunas líneas de células cancerosas. Los presentes inventores verificaron que el aptámero para el receptor de insulina es un agonista de la insulina y realiza la absorción de glucosa, pero no afecta a la división celular diferente a la insulina. Por lo tanto, el aptámero para el receptor de insulina de acuerdo con la presente divulgación no activa la vía MAPK diferente de la insulina, y preferiblemente no afecta las enfermedades causadas por la insulina mediante la activación de la ruta MAPK, y más preferiblemente se usa de manera útil para regular el azúcar en sangre sin afectar el aumento de incidencia de cáncer por el crecimiento de células cancerosas y arteriosclerosis por el crecimiento de células de músculo liso vascular.

Además, el aptámero puede modificar al menos uno o más nucleótidos posicionados en el extremo 5', el extremo 3', en el medio o ambos extremos, con el fin de mejorar la estabilidad en suero y regular la eliminación renal. La modificación puede ser que una o más clases seleccionadas del grupo que consiste en PEG (polietilenglicol), biotina, idT (desoxitimidina invertida), LNA (ácido nucleico bloqueado), 2'-metoxi nucleósido, 2'-amino nucleósido, 2'-F-nucleósido, el enlazador de amina, el enlazador de tiol y el colesterol, etc., se unen al extremo 5', al extremo 3', al medio o a ambos extremos y se modifican. El 2'-metoxi nucleósido, 2'-amino nucleósido o 2'-F-nucleósido invierte la resistencia a la nucleasa uniéndose a un nucleótido comprendido en el aptámero y proporciona un nucleótido modificado.

Preferiblemente, el aptámero puede comprender un nucleótido modificado para una administración *in vivo* optimizada asegurando la resistencia a las nucleasas y, más preferiblemente, la modificación puede ser 2'-OMe (metoxi) o 2'-F (flúor).

Se enlazan dos o más aptámeros de acuerdo con la presente divulgación, por lo que están presentes como un dímero o multímero.

Como se usa en la presente solicitud, el término "agonista del receptor de insulina" representa una preparación farmacéuticamente aceptable que se une selectivamente al receptor de insulina. Por lo general, el agonista del receptor de insulina representa un nuevo tipo de agente terapéutico para la diabetes desarrollado para regular eficazmente el azúcar en sangre. El agonista del receptor de insulina de la presente divulgación tiene la propiedad de unirse únicamente al receptor de insulina específicamente y no tiene efectos secundarios de incidencia de cáncer.

Por tanto, el agonista del receptor de insulina se puede utilizar para diagnosticar o tratar diversas enfermedades relacionadas con la insulina.

Por consiguiente, otro aspecto de la presente divulgación se refiere a una composición farmacéutica para prevenir o tratar enfermedades relacionadas con la insulina que comprende el aptámero como agonista del receptor de insulina. Otro aspecto se refiere a una composición para el diagnóstico de enfermedades relacionadas con la insulina que comprende el aptámero como agonista del receptor de insulina. La composición puede comprender además insulina. Las enfermedades relacionadas con la insulina pueden comprender diabetes, complicaciones diabéticas, síndrome metabólico, obesidad, enfermedades cardiovasculares, etc.

La composición farmacéutica se puede formular como diversas formas de administración oral o formas de administración parenteral. Por ejemplo, puede ser cualquier formulación para administración oral tal como comprimido, píldora, cápsula dura/blanda, líquido, suspensión, emulsionante, jarabe, gránulos, elixires, etc. Estas formulaciones para administración oral pueden comprender un vehículo farmacéuticamente aceptable tal como un diluyente, por ejemplo, lactosa, dextrosa, sacarosa, manitol, sorbitol, celulosa y/o glicina, o un deslizante como sílice, talco, ácido esteárico y su sal de magnesio o calcio y/o polietilenglicol, etc., otro ingrediente activo diferente de los anteriormente mencionados, de acuerdo con la composición común de cada formulación.

Además, cuando la formulación para administración oral es un comprimido, puede comprender un agente aglutinante tal como silicato de magnesio y aluminio, pasta de almidón, gelatina, tragacanto, metilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica y/o polivinilpirrolidina, etc. y según los casos, comprende un agente desintegrante tal como almidón, agar, ácido algínico o su sal sódica, mezcla similar y/o absorbente, colorante, agente saborizante o edulcorante, etc.

Además, la composición farmacéutica se puede formular como una forma de administración parenteral, y en este caso, se administra mediante un método de administración parenteral tal como inyección subcutánea, inyección intravenosa, inyección intramuscular o inyección intratorácica, etc. Luego, para formularla como formulación para administración parenteral, la composición farmacéutica se prepara como solución o suspensión mezclando un ingrediente activo, es decir, un derivado de la fórmula química I o su sal farmacéuticamente aceptable junto con un estabilizador o agente tamponador, y esta solución o suspensión se puede preparar como una forma de administración unitaria de ampolla o vial.

Además, la composición farmacéutica puede esterilizarse o comprender además un adyuvante tal como un conservante, estabilizador, polvo dispersable en agua o activador de emulsificación, sal para regular la ósmosis y/o agente tamponador, etc., y puede comprender además otro material útil terapéuticamente, y puede formularse de acuerdo con métodos comunes de mezcla, granulación o recubrimiento.

El sujeto para la administración de la composición farmacéutica de la presente divulgación puede ser un mamífero, incluido un ser humano, y preferiblemente puede ser un roedor o un ser humano.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método para proporcionar información para el diagnóstico de diabetes usando el aptámero para el receptor de insulina.

El método para proporcionar información para el diagnóstico de diabetes puede comprender

una etapa de preparación de una muestra biológica aislada;  
una etapa de respuesta del aptámero al receptor de insulina de acuerdo con la presente divulgación a la muestra biológica; y  
una etapa para medir el nivel de unión del aptámero al receptor de insulina en la muestra biológica, y se puede caracterizar por diagnosticar diabetes, cuando el nivel de unión del aptámero al receptor de insulina en la muestra biológica es superior al de una muestra normal.

La etapa de medir el nivel de unión del aptámero al receptor de insulina en la muestra biológica se puede realizar usando técnicas para medir la unión del aptámero de ADN que se usan comúnmente en el campo técnico relacionado, y por ejemplo, se puede usar un método para medir la intensidad de fluorescencia o radiactividad marcando materiales fluorescentes o radiactivos en el extremo del aptámero para el receptor de insulina, formación de imágenes para observar, etc., pero sin limitarse a ello.

[Efecto]

El aptámero para el receptor de insulina de la presente divulgación puede funcionar como un agonista sesgado que induce selectivamente funciones metabólicas del receptor de insulina mientras promueve la fosforilación del receptor de insulina para aumentar la absorción de glucosa. Además, es posible regular el azúcar en sangre a través del receptor de insulina sin causar diversas enfermedades causadas por la insulina por activación de la vía MAPK, tal como una mayor incidencia de cáncer, etc.

## [Breve descripción de los dibujos]

La Figura 1a muestra la secuencia de nucleótidos de los aptámeros IR-A48F e IR-A48.

La Figura 1b es una estructura secundaria de aptámero predicha por el programa Mfold del Ejemplo 1.6 y muestra que los nucleótidos de IR-A48 forman una estructura de tallo-bucle.

5 La Figura 1c es el resultado de medir si IR-A48F o IR-A48 se unen al receptor de insulina o al receptor de IGF-1 del Ejemplo 2.3.

La Figura 1d muestra la secuencia de nucleótidos de los aptámeros IR-A62F e IR-A62.

La Figura 1e es una estructura secundaria de aptámero predicha por el programa Mfold del Ejemplo 1.6 y muestra que los nucleótidos de IR-A62 forman una estructura de tallo-bucle.

10 La Figura 1f es el resultado de medir si IR-A62F o IR-A62 se une al receptor de insulina o al receptor de IGF-1 del Ejemplo 2.3.

La Figura 2a muestra el resultado experimental del Ejemplo 2.2 que mide el cambio de fluorescencia de FITC al tratar FITC-insulina (100 nmol/L) e IR-A48 a una concentración de 0,1, 0,25 y 1  $\mu$ m con fibroblasto Rat-1 (Rat-1/hIR) que sobreexpresa el receptor de insulina.

15 La Figura 2b muestra el resultado de confirmar la fosforilación de IRS, AKT, ERK por insulina e IR-A48 en la célula Rat-1/hIR del Ejemplo 3.2.

La Figura 2c muestra el resultado experimental del Ejemplo 2.2 que mide el cambio de fluorescencia de FITC tratando FITC-insulina (100 nmol/l) e IR-A62 a una concentración de 0,02, 0,1,0,025, 0,5 y 1  $\mu$ m con fibroblasto Rat-1 (Rat-1/hIR) que sobreexpresa el receptor de insulina.

20 La Figura 2d muestra el resultado de confirmar la fosforilación de IRS, AKT, ERK por insulina e IR-A62 en la célula Rat-1/hIR del Ejemplo 3.2.

La Figura 3a muestra el resultado de confirmar la fosforilación de Y960, Y1146, Y1150, Y1151, Y1316 y Y1322 en el receptor de insulina, provocada por insulina, IR-A48 e IR-A62 del Ejemplo 3.3.

La Figura 3b es el resultado de medir la especificidad de unión a la fosforilación de Y1150, Y1151 y Y1150/Y1151 de 10C3 y pAb que son anticuerpos contra el receptor de insulina del Ejemplo 3.3.

25 La Figura 3c es el resultado de observar la fosforilación del receptor de IGF-1 en la célula HeLa. La Figura 4a muestra el resultado de confirmar la fosforilación de la proteína receptora de insulina en el adipocito 3T3-L1 en el que se trata insulina (50 nmol/l) del Ejemplo 3.4.

La Figura 4b a la Figura 4d son los resultados del experimento del Ejemplo 3.4 que cuantifica la fosforilación de AKT (S473), AKT (T308) y ERK (T202/Y204), respectivamente, causada por insulina e IR-A48.

30 La Figura 5a es el resultado de confirmar el efecto que afecta al crecimiento celular mediante el tratamiento de insulina e IR-A48 para células MCF-7, respectivamente, del Ejemplo 5, y la Figura 5b es el resultado de confirmar el efecto que afecta al crecimiento celular mediante el tratamiento de la insulina y la mezcla de insulina e IR-A48 en células MCF-7, y la Figura 5c es el resultado de confirmar si la insulina y el IR-A48 fosforilan Y1150 y AKT S473 del receptor de insulina en células MCF-7.

35 La Figura 6a es un gráfico que muestra la absorción de glucosa en función del tiempo mediante el tratamiento de insulina, IR-A48, y la mezcla de insulina e IR-A48 con adipocito 3T3-L1 del Ejemplo 4.1.

La Figura 6b es el resultado del Ejemplo 4.1 observando la absorción de glucosa después del tratamiento durante 30 min y 4 h, respectivamente, para medir la actividad de acuerdo con la concentración de insulina e IR-A48.

40 La Figura 6c es el resultado de comparar e investigar el aumento de la absorción de glucosa causado por IR-A48 (tratamiento durante 2 horas) e insulina (tratamiento durante 30 minutos), después de pretratar el inhibidor de PI3K (LY294002) durante 1 hora en 3T3-L1, para confirmar que la actividad de IR-A48 se transfiere a través de PI3K del Ejemplo 4.2, y la Figura 6d es el resultado de comparar e investigar la fosforilación de AKT causada por IR-A48 (tratamiento durante 2 horas) e insulina (tratamiento durante 30 minutos), después de pretratar el inhibidor de PI3K (LY294002) durante 1 hora en 3T3-L1, con el fin de confirmar que la actividad de IR-A48 se transfiere a través de PI3K.

45 La Figura 7 es el resultado de observar el cambio de azúcar en sangre durante 120 min, después de administrar 0,6 U/kg de insulina y 2,5, 5, 10 mg/kg de IR-A48 a los ratones del Ejemplo 6.

## [Descripción detallada – Ejemplos]

50 A continuación, se describirán en detalle con ejemplos la configuración y el efecto de la presente divulgación. Sin embargo, los siguientes ejemplos se proporcionan sólo con fines ilustrativos con el fin de ayudar a comprender la presente divulgación, y el alcance y extensión de la presente divulgación no están limitados por ellos.

## 55 Preparación de anticuerpos y reactivos

La proteína receptora de insulina humana se adquirió a través de R&D System (Minneapolis, MN) y se usó. El aptámero utilizado fue sintetizado por Aptamer Science, Inc. (Pohang, Corea) y ST Pharm (Siheung, Corea). Los anticuerpos utilizados para la transferencia Western fueron los siguientes: anticuerpos Anti-fósforo-ERK (T202/Y204), Anti-AKT, Anti-fósforo-AKT (S473), Anti-fósforo-AKT (T308), anti-fosfo-FoxO1/3a (T24/T32) y anti-fosfo-AS160 (T642) (señalización, Beverly, MA). Subunidad  $\beta$  anti-IR (C-19), subunidad  $\beta$  anti-IGF-1R (C-20), anti-fosfo-IR (10C3, Y1150/Y1151), anti-fosfo-IRS1 (Y632) y anti-fosfo-Shc (Y239/Y240) adquiridos a través de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). Anti-fosfo-tirosina (4G10), anti-fosfo-IRS1 (Y612) humano/(Y608) de ratón y anti-fosfo-IR (Y1146) (Millipore, Darmstadt, Alemania). Anti-fosfo-IR (Y960), anti-fosfo-IR (pAb, Y1150/Y1151), anti-fosfo-IR (Y1316), anti-fosfo-IR (Y1322), anti-fosfo-IR (Y1146/Y1150/Y1151) (Invitrogen, Carlsbad, CA).

## Cultivo y diferenciación celular

La línea celular de cáncer de mama humano MCF7, la célula renal embrionaria humana HEK293 y el adipocito de ratón 3T3-L1 se adquirieron en la American Type Culture Collection (Manassas, VA, Estados Unidos). El fibrocyto Rat-1 (Rat-1/hIR) en el que el receptor de insulina estaba sobreexpresado fue proporcionado por el Dr. Nicholas J. G. Webster de la Universidad de California. Se cultivaron MCF7, HEK293 y Rat-1/hIR en condiciones de 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub> en medio de Eagle modificado de Dulbecco (Lonza) en el que se suplementaron suero fetal bovino al 10% (Gibco), penicilina (100 unidades/ml) y estreptomocina (100 unidades/ml). Se cultivó 3T3-L1 a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub> en medio de Eagle modificado de Dulbecco (Lonza) en el que se suplementaron suero bovino al 0% (Gibco), penicilina (100 unidades/ml) y estreptomocina (100 unidades/ml).

Después de seguir cultivando la célula desarrollada como saturada para la diferenciación del adipocito de 3T3-L1, se trató DMEM que contenía dexametasona 1 µM, IBMX 500 nM, insulina 850 nM y FBS al 10% durante 2 días. Luego, se trató DMEM que contenía insulina 850 nM y FBS al 10% durante 2 días y se trató DMEM que contenía sólo FBS al 10% durante 5-6 días hasta que se completó la diferenciación a adipocito.

### Ejemplo 1: Excavación del aptámero para receptor de insulina

Los aptámeros que se unen a un dominio extracelular del receptor de insulina se excavaron usando SELEX. Se progresó en SELEX usando una biblioteca de ADN monocatenario que constaba de 40 mer de secuencia de nucleótidos variable y secuencias de nucleótidos constantes que están presentes en ambos lados cada uno como 20 mer (SEQ ID NO: 3).

#### 1.1 Síntesis de la biblioteca de ácidos nucleicos modificada

Para preparar una biblioteca de ADN modificado de cadena sencilla necesaria para SELEX, se sintetizó una biblioteca antisentido en la que se sintetizó biotina unida a 5' (SEQ ID NO: 3). La biblioteca antisentido respondió con 50 µM de cebador inverso (SEQ ID NO: 4) a 70 °C durante 1 hora en 0,5 mM de dNTP (ATP, GTP, CTP, Bz-dU), 0,25 U/µl de KOD XL (Invitrogen), tampón de extensión 10X (Tris-HCl 1,2 M pH 7,8, KCl 100 mM, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 60 mM, MgSO<sub>4</sub> 70 mM, TritonX-100 al 1%, 1 mg/ml de BSA) para preparar un ADN de doble hélice. La biblioteca de ADN modificado de cadena sencilla se eluyó usando NaOH 20 mM y luego se neutralizó con una solución de HCl. La biblioteca de ADN preparada se concentró usando Amicon ultra-15 (Millipore) y luego se cuantificó con un espectrofotómetro.

#### 1.2. Enlace con el receptor de insulina

Después de poner 1 nmol de la biblioteca sintetizada en un tampón de selección (HEPES 200 mM, NaCl 510 mM, KCl 25 mM, MgCl<sub>2</sub> 25 mM) y hacer reaccionar a 95 °C, 70 °C, 48 °C, 37 °C durante 5 min, respectivamente, se mezclaron 10 µL de tampón de competición de proteínas 10X (protrombina 10 µM, caseína 10 µM, HSA (albúmina de suero humano, SIGMA) al 0,1% (p/v) para la selección negativa, y luego se añadió a una suspensión de estreptavidina C1 Dynabeads® MyOne<sup>MR</sup> (perlas de SA) (suspensión al 50% (v/v), 10 mg/ml de Invitrogen) en la que se eliminó el sobrenadante y se hizo reaccionar a 37 °C durante 10 min.

Después de la respuesta de selección negativa, solo se recogió el sobrenadante y se trasladó a un nuevo tubo, y luego reaccionó en Dynabead TALON unido a la proteína receptora de insulina a la que se unió la etiqueta de His a 37 °C durante 1 hora. Dynabeads TALON al que se unieron el ADN y el receptor de insulina se lavaron 5 veces con 100 µl del tampón de selección (HEPES 200 mM, NaCl 510 mM, KCl 25 mM, MgCl<sub>2</sub> 25 mM). En el quinto lavado, se trasladó a una nueva placa y se lavó. Se añadieron 85 µl de solución de NaOH 2 mM y se eluyó la biblioteca que se une a la diana, y luego se neutralizó con 20 µl de solución de HCl 8 mM.

#### 1.3 Amplificación

La biblioteca de ADN que se une a la diana se amplificó usando QPCR (PCR cuantitativa, sistema de detección de PCR en tiempo real multicolor IQ5, Bio-Rad). El cebador inverso anterior (SEQ ID NO: 4) y la biblioteca antisentido (SEQ ID NO: 3) utilizados para la preparación de la biblioteca se mezclaron de modo que el volumen total de 5 µM (mezcla maestra QPCR 5 X, Novagen), 0,075 U/µl de KOD (Novagen), dNTP 1 mM (Roche Applied Science), MgCl<sub>2</sub> 25 mM, 5XSYBRgreen I (Invitrogen) era 125 µl, respectivamente, preparando así una biblioteca monocatenaria repitiendo una vez bajo la condición de 96 °C 15 segundos, 55 °C 10 segundos, y 68 °C 30 min, y 30 veces bajo la condición de 96 °C 15 seg, y 72 °C 1 min.

#### 1.4. Preparación de eADN

eADN significa un aptámero producido mediante el uso de plantilla de ADN y polimerasa como un ADN enzimático. La biblioteca de ADN preparada mediante la QPCR anterior se mezcló en 25 µl de perlas de SA Myone (Invitrogen) a temperatura ambiente durante 10 min y se fijó. Luego, la cantidad de ADN mezclado fue de 60 µl como producto de la QPCR. Se añadió una solución de NaOH 20 mM y se convirtió en un ADN monocatenario. Y el ADN que comprende el ácido nucleico modificado por el mismo método que la preparación de la biblioteca del Ejemplo 1.1 se sintetizó y

usó la próxima vez. La ronda de SELEX se llevó a cabo 8 veces en total, y para una unión más selectiva, de la cuarta a la sexta vez y de la séptima a la octava vez, el complejo de ADN y proteína (Integrina Vβ3) se diluyó en una solución de  $\text{DxSO}_4$  (sigma) 10 mM hasta 1/200, 1/400, respectivamente, y luego se clasificó el aptámero.

#### 5 1.5. Análisis de la secuencia de nucleótidos del aptámero

Después de pasar 8 veces por rondas SELEX, su salida se amplificó como un ADN bicatenario mediante el método de QPCR, y luego se clonó usando el kit de clonación TA (SolGent). Y la secuencia de nucleótidos del aptámero se obtuvo mediante secuenciación con el cebador M13 que estaba presente en el vector (SEQ ID NO: 5).

10

#### 1.6. Secuenciación óptima de aptámeros

El aptámero excavado (1  $\mu\text{M}$ ) se trató con una célula HEK293 en la que se sobreexpresó el receptor de insulina para encontrar el aptámero, para analizar si aumentaba la fosforilación de AKT S473. La mayoría de los aptámeros no tuvieron ningún efecto, pero los aptámeros IR-A48F e IR-A62F excavados aumentaron significativamente la fosforilación de AKT. La secuencia de IR-A48F e IR-A62F consiste en 80 mer que comprende 8 de Nap-dU en la región variable (Figura 1a, Figura 1d), y la minimización de la secuencia del aptámero se llevó a cabo basándose en la estructura secundaria del aptámero para encontrar la secuencia mínima de aptámero necesaria para unirse al objetivo.

15

20

La estructura secundaria del aptámero IR-A48F predicho por el programa Mfold se mostró en la Figura 1b, y 33 de los nucleótidos en el aptámero, incluidos 6 de Nap-dU, formaron una estructura de tallo-bucle estable. La estructura secundaria del aptámero IR-A62F predicho por el programa Mfold se mostró en la Figura 1e, y 27 de los nucleótidos en el aptámero, incluidos 6 de Nap-dU, formaron una estructura de tallo-bucle estable.

25

Como resultado del experimento anterior, se verificó que esta secuencia de tallo-bucle interno (IR-A48) (Kd 3,5 nM) se unía al receptor de insulina a un nivel similar al de IR-A48F (Kd 6,9 nM) mediante análisis de la unión al objetivo. Además, se verificó que IR-A48 tenía una especificidad muy alta por el receptor de insulina, ya que no se unía al receptor del factor 1 de crecimiento similar a la insulina (IGF-1) que tenía una estructura muy similar al receptor de insulina. De forma similar, como resultado de investigar el efecto de IR-A48 en la fosforilación del receptor de IGF-1 usando el anticuerpo 10C3, IR-A48 no afectó en absoluto a la fosforilación del receptor de IGF-1, a diferencia de la insulina. El resultado se mostró en la Figura 1c y la Figura 3c.

30

Además, se verificó que la secuencia de tallo-bucle interno (IR-A62) (Kd 2,4 nM) se unía al receptor de insulina a un nivel similar al de IR-A48F (Kd 26,9 nM) mediante análisis de unión a la diana. Además, se verificó que IR-A62 tenía una especificidad muy alta por el receptor de insulina, ya que no se unía al receptor del factor 1 de crecimiento similar a la insulina (IGF-1) que tenía una estructura muy similar al receptor de insulina. De manera similar, como resultado de investigar el efecto de IR-A62 en la fosforilación del receptor de IGF-1 usando el anticuerpo 10C3, IR-A48 no afectó en absoluto a la fosforilación del receptor de IGF-1, a diferencia de la insulina. El resultado se mostró en la Figura 1f y la Figura 3c.

35

40

Todos los siguientes experimentos se llevaron a cabo utilizando IR-A48 e IR-A62 en los que se progresó la minimización.

45

#### 1.7. Síntesis y purificación de aptámeros

El aptámero fue sintetizado por nosotros mediante el método de síntesis de oligonucleótidos en fase sólida utilizando el sintetizador Mermade 12 de Bioautomation Company, que es un sintetizador fijo solo de ácido nucleico. Se sintetizó con química de b-cianoetilfosforamidita en fase sólida utilizando un sintetizador de oligonucleótidos (Bioautomation, Mermade12), y después de la síntesis, se puso CPG (columna de síntesis de 200 nmoles, 1.000A (MM1-1000-)) en una solución de escisión [t-butilamina:metanol:agua (relación en volumen 1:1:2)] y se secó al vacío, y luego se aisló/purificó usando HPLC (GE, AKTA basic). La columna utilizada fue la columna RP-C18 (Waters, Xbridge OST C18, 10 x 50 mm), y se utilizó tampón TEAB/acetronitrilo 0,1 M en condiciones de UV 254 nm/290 nm, caudal: 5 ml/min, temperatura: 65 °C. Para estos aptámeros, sus pesos moleculares precisos se midieron en un intervalo de error de 0,02% con un espectrómetro LC-ESI MS (Waters HPLC systems (Waters) + Qtrap2000 (ABI)) y se obtuvo un 80-90% en la medición de pureza usando HPLC.

50

55

Ejemplo 2: Propiedades de unión del aptámero al receptor de insulina

60

#### 2.1. Preparación para el experimento celular

Antes de tratar el aptámero, las células se trataron en DMEM sin FBS durante 3 horas por deficiencia de suero. Luego, durante 1 hora, las células se trataron en tampón HEPES de Krebs-Ringer [HEPES 25 mM (pH 7,4), NaCl 120 mM, KCl 5 mM,  $\text{MgSO}_4$  1,2 mM,  $\text{CaCl}_2$  1,3 mM y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,3 mM]. Todos los aptámeros para el tratamiento celular se prepararon en el tampón HEPES de Krebs-Ringer equivalente y se pasaron por un proceso de calentamiento a 95 °C

65



durante 5 min y enfriamiento a temperatura ambiente lentamente para la formación de una estructura secundaria precisa.

## 2.2. Ensayo de competición de insulina

Con el fin de investigar las propiedades de unión al receptor de insulina de los IR-A48 e IR-A62 excavados en el Ejemplo 1, se avanzó en el ensayo de competición de insulina usando citometría de flujo. Se extrajo la célula Rat-1/hIR de un recipiente de cultivo celular usando PBS que contenía EDTA 5 mM. Se trató un tampón de bloqueo (PBS, BSA al 1% y  $\text{NaN}_3$  al 0,1%) con la célula preparada y se hizo reaccionar a 4 °C durante 30 min a 20 rpm. Luego, la insulina a la que se unió FITC se trató con diversas concentraciones de IR-A48 y se hizo reaccionar a 4 °C durante 1 hora para que cada unión se equilibre. Después de lavar la célula dos veces con PBS, se fijó a temperatura ambiente durante 30 min con PBS que contenía paraformaldehído al 4%. La cantidad de insulina que se unió a la célula se observó midiendo la fluorescencia de FITC mediante una citometría de flujo (BD FACSCanto<sup>MR</sup> II).

Como resultado, se verificó que IR-A49 no interfirió con la unión de la insulina, aunque tenía actividad como agonista (Figura 2a). Esto significa que IR-A48 se une a un sitio alostérico completamente diferente, no a un sitio ortostérico en el que se une la insulina. Se verificó que IR-A62 tenía una cooperatividad positiva que aumenta la unión de insulina, aunque tenía actividad como agonista (Figura 2c).

## 2.3. Ensayo de unión al filtro

Para investigar la capacidad de unión del aptámero seleccionado, se llevó a cabo un ensayo de unión al filtro. Al principio, se marcó  $\alpha$ -P32ATP (PerkinElmer) con TdT (desoxinucleotidil transferasa terminal, NEB) en el extremo 5' del aptámero. El aptámero  $\alpha$ -P32ATP 1  $\mu\text{M}$  0,25  $\mu\text{l}$ , (5  $\mu\text{M}$ , Perkin Elmer), 0,25  $\mu\text{l}$ , TdT y tampón4 NEB 10X se hicieron reaccionar en 10  $\mu\text{l}$  de volumen de reacción a 37 °C durante 30 min, y se incubaron a 70 °C durante 10 min, para inactivar TdT. El conjunto de ADN marcado se purificó utilizando una columna Micro spin G-50 (GE healthcare).

El aptámero marcado a 20.000 cpm se colocó en 100  $\mu\text{l}$  de tampón SB 1x (HEPES 200 mM, NaCl 510 mM, KCl 25 mM,  $\text{MgCl}_2$  25 mM) y se enfrió lentamente a 37 °C a razón de 0,1°C por segundo desde 95 °C. Y, después de que la proteína receptora de insulina se diluyó en orden como 102 puntos a 100 nM usando tampón (HEPES 200 mM, NaCl 510 mM, KCl 25 mM,  $\text{MgCl}_2$  25 mM), se añadieron 30  $\mu\text{l}$  del conjunto de ADN calentado y enfriado respectivamente y se hizo reaccionar a 37 °C por 30 minutos. Después de colocar la mezcla de ADN e integrina  $\alpha\text{V}\beta 3$  como 2  $\mu\text{l}$ , respectivamente, en la membrana de nailon (GE healthcare), se añadieron 5,5  $\mu\text{l}$  de resina zorbax (Agilent). Y se colocó en un filtro Durapore (Millipore) humedecido con 50  $\mu\text{l}$  de tampón SB 1X (HEPES 200 mM, NaCl 510 mM, KCl 25 mM,  $\text{MgCl}_2$  25 mM) por adelantado y se hizo vacío. Luego, el filtro de membrana se lavó con 100  $\mu\text{l}$  de tampón de selección 1X (HEPES 200 mM, NaCl 510 mM, KCl 25 mM,  $\text{MgCl}_2$  25 mM). Después de exponer la placa de filtro a una placa para obtención de imágenes durante la noche, la imagen se cuantificó con FLA-5100 (Fuji).

Como resultado, se verificó que las  $K_d$  de IR-A48 e IRA48F eran 3,5 nM y 6,9 nM, respectivamente, y que IR-A48 se unía al receptor de insulina, pero no se unía al receptor de IFG-1. El resultado se mostró en la Figura 1c.

Además, se verificó que las  $K_d$  de IR-A62 e IR-A62F eran 2,4 nM y 26,9 nM, respectivamente, y que IR-A62 se unía al receptor de insulina, pero no se unía al receptor de IFG-1. El resultado se mostró en la Figura 1f.

## Ejemplo 3: Fosforilación del aptámero para el receptor de insulina

### 3.1. Transferencia Western

Para observar la fosforilación del receptor de insulina y la proteína de transmisión de señales, las células se disolvieron en un tampón de disolución [Tris-HCl 50 mM (pH 7,4), NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, NaF 20 mM,  $\beta$ -glicerofosfato 10 mM,  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  2 mM, PMSF 1 mM, glicerol al 10%, Triton-X al 1% y cócteles inhibidores de proteasa]. Los lisados se centrifugaron a 95 °C durante 15 min a 14.000 rpm, para aislar la proteína. Los lisados preparados se sometieron a electroforesis en SDS-PAGE al 6% ~ 16% y se trasladaron a una membrana de nitrocelulosa. Después de hacer reaccionar el anticuerpo primario con la membrana a 4 °C durante 12 horas, el anticuerpo secundario al que se unió HRP (peroxidasa de rábano picante) o IRDye800CW (LI-COR) se hizo reaccionar a temperatura ambiente durante 1 hora. La presencia de proteína y el nivel de fosforilación se midieron usando quimioluminiscencia por ECL (Thermo Scientific, MA) o sistema de fluorescencia infrarroja (Odyssey, LI-COR).

### 3.2. Fosforilación del receptor de insulina

Para investigar el efecto de los aptámeros IR-A48 e IR-A62 del Ejemplo 1 sobre la unión de la insulina, se observó el nivel de fosforilación del receptor de insulina mediante la transferencia Western antes mencionada en el caso de tratar IR-A48, IR- A62 e insulina, y el resultado se muestra en la Figura 2b y la Figura 2d.

La fosforilación de IRS, AKT y ERK causada por insulina en células Rat-1/hIR no se vio afectada, aunque IR-A48 o IA-A62 se trataron juntos. Sin embargo, la fosforilación del receptor de insulina causada por IR-A48 o IR-A62 fue

diferente de la insulina. La fosforilación de Y1150/Y1151 de la región del receptor de insulina quinasa aumentó tanto por insulina como por IR-A48 o IR-A62. Cuando se trató Ir-A48 con insulina, la fosforilación de Y1150/Y1151 aumentó de manera cooperativa, y cuando se trató IR-A48 con insulina, la fosforilación de Y1150/Y1151 se amplificó enormemente. La fosforilación total de tirosina aumentó en gran medida solo con la insulina, y el efecto de IR-A48 e IR-A62 fue insignificante. Tomados en conjunto, estos resultados mostraron que el IR-A48 funcionaba independientemente de la insulina y el IR-A62 amplificaba la actividad de la insulina, pero la actividad se ponderaba hacia la tirosina específica (Y1150/Y1151) en la región de la quinasa.

### 3.3. ELISA- fosforilación de tirosina intracelular

Para investigar el efecto de la fosforilación de los aptámeros IR-A48 e IR-A62 excavados en el Ejemplo 1, se utilizaron 6 tipos de anticuerpos. Cuando la insulina se une al receptor, 7 de las tirosinas (Y953, Y960, Y1146, Y1150, Y1151, Y1316 e Y1322) se fosforilan, pero un anticuerpo contra Y953 entre ellos no se desarrolló, por lo que se experimentaron 6 tipos de tirosinas en total.

Se realizó un ELISA para observar la especificidad del antígeno del anticuerpo, y al principio, se sintetizaron 3 tipos de péptidos (MTRDIYETD-pY-pY-RKGGKGLL, MTRDIYETD-pY-YRKGGKGLL, MTRDIYETDY-pY-RKGGKGLL) utilizados como antígenos en Selleckchem (Houston, TX). Se hicieron reaccionar 20 pmol/100 µl de péptido fundido en PBS a 4 °C durante 12 horas en una placa de 96 pocillos (Corning, MA) recubierta con grupos éster de N-oxisuccinimida y unidos mediante enlaces covalentes. Después de bloquear durante 1 hora con PBS que contenía BSA al 1%, se lavó con tampón TTBS [Tris-HCl 50 mM (pH 7,6), NaCl 150 mM y Tween-20 al 0,05%] una vez. Después de diluir los anticuerpos en tampón TTBS 1:1.000, se unió al antígeno que se unió a la placa de 96 pocillos. Después de lavar con tampón TTBS 3 veces, se diluyó con el anticuerpo secundario al que se unió AP (fosfatasa alcalina) 1:2000, y se unió a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de lavar con tampón TTBS 3 veces, se añadieron 100 µl de CSPD y se hizo reaccionar a temperatura ambiente durante 30 min, y luego se midió la luminiscencia química usando un fotómetro (Luminoskan Ascent).

Para demostrar claramente la fosforilación sesgada a Y1150/Y1151, se usaron 2 tipos diferentes de anticuerpos pY1150/pY1151: 10C3 (sc-81500, Santa Cruz), pAb (44804G, Invitrogen). Además, dado que Y1150 e Y1151 se fosforilaron de forma independiente, se asumió que dos anticuerpos tenían especificidad por pY1150, pY1151, pY1150/pY1151, diferentes entre sí, respectivamente, y para demostrar que la especificidad del anticuerpo se verificó mediante ELISA preparando los péptidos sintetizados correspondientes a pY1150, pY1151, pY1150/pY1151.

El resultado se mostró en la Figura 3a, y se demostró que la insulina aumentaba toda la fosforilación de Y960, Y1146, Y1150, Y1151, Y1316, Y1322, pero IR-A48 e IR-A62 aumentaban la fosforilación de Y1150/Y1151 de la región quinasa únicamente.

Como puede verse en la Figura 3b, el anticuerpo 10C3 se unió a pY1150/pY1151 y pY1150 todos a un nivel similar, pero el anticuerpo pAb se unió fuertemente a pY1150/pY1151 solamente. Se demostró que IR-A48 es un agonista sesgado que fosforila Y1150 de la región del receptor quinasa de insulina sólo preferentemente por el resultado.

### 3.4. Fosforilación de la proteína de transmisión de señales

El efecto de la fosforilación de Y1150 provocada por IR-A48 excavado en el Ejemplo 1 sobre la transmisión de la señal de insulina se comparó con la insulina.

Como resultado del experimento anterior, IR-A48 activó la transmisión de señales comparable a la insulina. La fosforilación del receptor de insulina y proteínas tales como IRS, AKT, ERK, etc. en el adipocito 3t3-L1 en el que se trató con insulina (50 nmol/L) aumentó rápidamente durante 5 min y, con el paso del tiempo, disminuyó gradualmente. IR-A48 (200 nmol/l) aumentó la fosforilación de RS (Y608, Y632), AKT (T308, S473), AS160 (T642), GSK3  $\alpha/\beta$  (S21/S9), FOXO1/3a (T24/T32) lentamente durante 2 horas y la fosforilación continuó durante 4 horas, en contraste con la insulina. El resultado anterior se mostró en la Figura 4a.

La fosforilación del receptor de insulina desempeña dos funciones en la transmisión de señales y, en primer lugar, la fosforilación de la región de la quinasa (Y1146, Y1150, Y1151) regula la actividad de la quinasa y, en segundo lugar, la fosforilación de Y960 e Y1322 se utiliza para la posición de unión de la proteína de transmisión de señales que se une al receptor de insulina. Teniendo en cuenta esta fosforilación sesgada a Y1150, se verificó que IR-A48 exhibió un efecto inesperado al mostrar la actividad de transmisión de señales al nivel de insulina, aunque se consideró que IR-A48 no aumentaba mucho la transmisión de señales de insulina debido a la baja fosforilación de otras tirosinas.

Sobre todo, IR-A48 exhibió la actividad sesgada hacia la transmisión de señal de insulina sesgada específica. El IR-A48 mostró aproximadamente un 98% de alto nivel de fosforilación en comparación con la insulina de AKT S483, pero la fosforilación de AKR T308 permaneció sólo en el 37% (Figura 4A, 4B y 4C). Además, IR-A48 apenas afectó a la fosforilación de EKR (Figura 4A y 4D). Como tal, el IR-A48 activó la transmisión de señales del receptor de insulina, pero tenía propiedades completamente diferentes a las de la transmisión de señales por la insulina.

Ejemplo 4: Absorción de glucosa del aptámero para el receptor de insulina

4.1 Absorción de glucosa en el adipocito 3T3-L1

5 Dado que el IR-A48 excavado en el Ejemplo 1 aumentó la fosforilación de AKT S473, se investigó la actividad de IR-A48 para la absorción de glucosa en el adipocito 3T3-L1.

10 Para la deficiencia de suero, el adipocito 3T3-L1 completamente diferenciado se trató en DMEM sin FBS durante 3 horas, y luego se trató con tampón HEPES de Krebs-Ringer durante 1 hora. Después de tratar insulina o aptámero durante horas relevantes, se trató 2-desoxi[14C]glucosa (0,1  $\mu$ Ci/ml) durante 10 min. Se lavó con PBS en el que se añadió glucosa 20 mM 3 veces, y la célula se fundió con una solución que contenía NaOH 0,5 N y SDS al 1%. La cantidad de 2-desoxi-D-glucosa absorbida en la célula se observó usando un contador de centelleo líquido.

15 Cuando se trató insulina (50 nmol/L) con adipocito 3T3-L1, la absorción de glucosa aumentó al máximo de 30 min a 1 h, pero disminuyó lentamente y después de 8 h, disminuyó por debajo de la mitad. A pesar de la fosforilación sesgada a Y1150, IR-A48 (200 nmol/L) aumentó la absorción de glucosa a un nivel similar al de la insulina. Sin embargo, similar al patrón de fosforilación de la proteína de transmisión de señales, la absorción de glucosa también aumentó lentamente a las 4 horas y se mantuvo durante 8 horas. Además, cuando el IR-A48 y la insulina se trataron juntos, la absorción de glucosa aumentó de manera cooperativa debido a la unión alostérica de IR-A48. El resultado se mostró en la Figura 6a.

20 A pesar del lento aumento de la velocidad, IR-A48 aumentó suficientemente hasta una concentración alta. Para medir la actividad de la insulina y del IR-A48 de acuerdo con la concentración, se observó la absorción de glucosa en el momento del tratamiento cuando se mostró la respuesta más alta, respectivamente (la insulina fue de 30 min, IR-A48 fue de 4 h). A la concentración más alta, tanto la insulina como el IR-A48 exhibieron un nivel similar de absorción de glucosa saturada. Sin embargo, la insulina exhibió un aumento lento de la absorción de glucosa de acuerdo con la concentración (coeficiente de Hill: 0,77), pero el IR-A48 mostró una forma rápidamente aumentada entre 20 nmol/l y 200 nmol/l (coeficiente de Hill: 0,77). Como resultado, la  $CE_{50}$  de IR-A48 (66,2 nmol/l) fue más alta que la de la insulina (8,9 nmol/l), pero la  $CE_{95}$  de IR-A48 (202,4 nmol/l) fue ligeramente más baja que la de la insulina (261,9 nmol/l). El resultado se mostró en la Figura 6b.

4.2 Inducción de la absorción de glucosa por PI3K

35 Para verificar si la actividad de IR-A48 excavada en el Ejemplo 1 se transfirió a través de PI3K, se investigó el aumento de la fosforilación de AKT y la absorción de glucosa por IR-A48, después de tratar el inhibidor de PI3K (LY294002) en 3T3-L1 durante 1 hora. Como resultado, se verificó que no sólo la absorción de glucosa por IR-A48 sino también la fosforilación de AKT fueron inhibidas por LY294002. El resultado se mostró en la Figura 6c y la Figura 6d, y esto mostró que el aumento de la fosforilación de AKT y la absorción de glucosa por IR-A48 fue inducido por PI3K al igual que la insulina.

40 Ejemplo 5: Inducción del crecimiento de células cancerosas

45 Para investigar el efecto sobre la división celular de IR-A48 excavado en el Ejemplo 1, se usó la línea celular de cáncer MCF-7 que se usó ampliamente para experimentar la capacidad de inducir la división celular de la insulina.

50 Después de cultivar células MCF7 en una placa de 24 pocillos a razón de 10.000 células por pocillo, se cultivó durante 24 h. Para la deficiencia de suero, se cultivó adicionalmente con FBS al 0,5% DMEM durante 24 horas. Se trató insulina o aptámero durante 72 horas, y el medio se reemplazó de nuevo cada 24 horas. Después de finalizar el tratamiento, la célula se fijó a temperatura ambiente durante 30 min con PBS que contenía paraformaldehído al 4%. El ADN que tenía la célula se tiñó con PBS que contenía pigmento fluorescente SYTO60 1  $\mu$ M, y luego se midió la fluorescencia con el escáner LI-COR Odyssey, cuantificando así la cantidad de células.

55 Como resultado de tratar la insulina y el IR-A48 a MCF-7 por separado, respectivamente, la insulina aumentó la división celular 2,1 veces, pero el IR-A48 no la afectó en absoluto. Además, cuando se mezcló IR-A48 (1  $\mu$ mol/l) y se trató con insulina, tampoco afectó en absoluto la división celular por la insulina. Con el fin de excluir la posibilidad de que IR-A48 no activara el receptor de insulina que estaba presente en las células MCF-7, se verificó la transmisión de la señal de insulina por IR-A48 en las células MCF-7. Como resultado, se verificó que fosforilaba el receptor de insulina Y1150 y AKT S473 en las células MCF-7 al igual que el adipocito 3T3-L1. El resultado se mostró en la Figura 5a a la Figura 5c, y como resultado, se demostró que la transmisión de la señal inducida por IR-A48 tenía una función completamente separada con la inducción de la división celular por el receptor de insulina.

60 Ejemplo 6: experimento de azúcar en sangre *in vivo*

65 Para demostrar los resultados del Ejemplo 3 al Ejemplo 6 *in vivo*, se midió el efecto sobre el azúcar en sangre de los ratones de IR-A48 excavados en el Ejemplo 1.

Para evitar que el IR-A48 fuera rápidamente degradado por la exonucleasa 3' en sangre, se añadió desoxitimidina invertida (idT) al extremo 3' del IR-A48. Después de un ayuno de 8 semanas de edad de ratones experimentales C57Bl/6J macho durante 12 horas, se fundieron 10 mg/kg, 5 mg/kg, 2,5 mg/kg de IR-A48 en PBS y se administraron mediante inyección intravenosa a los ratones experimentales. Cuando pasaron 15 minutos, 30 minutos, 60 minutos, 90 minutos y 12 minutos después de la administración, se observó el cambio de azúcar en sangre con un dispositivo de control de azúcar en sangre (Accu-Check Active; Roche Diagnostics) mediante la extracción de sangre de sus colas. En 30 minutos después de la administración, el azúcar en sangre del ratón en el que se administraron 10 mg/kg de IR-A48 (reducción del 41%) se redujo a un nivel similar a 0,6 unidades/kg de insulina (reducción del 51%). Sin embargo, a diferencia de la insulina en la que el azúcar en sangre se recuperó rápidamente en 30 minutos, para los ratones en los que se administró IR-A48, el azúcar en sangre mostró un patrón de disminución persistente de 1 hora y, después de eso, se recuperó lentamente. El resultado se mostró en la Figura 7.

Se verificó que IR-A48 tenía la actividad no solo *in vitro* sino también *in vivo* a través de esto, y esto mostró que IR-A48 podía regular el azúcar en sangre independientemente de la insulina a través de la regulación alostérica.

<110> POSTECH ACADEMY-INDUSTRY FOUNDATION posco

<120> Aptámero contra el receptor de insulina y la composición farmacéutica que lo contiene

<130> OPP20154311KR

<160> 7

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 80

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> IR-A48F

<220>

<221> característica miscelánea

<222> (8)

<223> 2-desoxiuridina modificada por un grupo hidrófobo seleccionado del grupo que consiste en bencilo, naftilo, pirrolbencilo y triptofanilo

<220>

<221> característica miscelánea

<222> (10) ... (11)

<223> 2-desoxiuridina modificada por un grupo hidrófobo seleccionado del grupo que consiste en bencilo, naftilo, pirrolbencilo y triptofanilo

<220>

<221> característica miscelánea

<222> (21)

<223> 2-desoxiuridina modificada por un grupo hidrófobo seleccionado del grupo que consiste en bencilo, naftilo, pirrolbencilo y triptofanilo

<220>

<221> característica miscelánea

<222> (23)

<223> 2-desoxiuridina modificada por un grupo hidrófobo seleccionado del grupo que consiste en bencilo, naftilo, pirrolbencilo y triptofanilo

<220>

<221> característica miscelánea

<222> (27)

<223> 2-desoxiuridina modificada por un grupo hidrófobo seleccionado del grupo que consiste en bencilo, naftilo, pirrolbencilo y triptofanilo

<400> 1

65

ES 2 899 917 T3

tatgagtgac cgccgcctg gngnnaagac aaccncnagg ncaggcgag ngacgggnag 60  
 cagccacacc accagccaaa 80

<210> 2  
 <211> 33  
 <212> ADN  
 5 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> IR-A48

10 <220>  
 <221> característica miscelánea  
 <222> (8)  
 <223> 2-desoxiuridina modificada por un grupo hidrófobo seleccionado del grupo que consiste en bencilo, naftilo, pirrolbencilo y triptofanilo

15 <220>  
 <221> característica miscelánea  
 <222> (10) ... (11)  
 <223> 2-desoxiuridina modificada por un grupo hidrófobo seleccionado del grupo que consiste en bencilo, naftilo, pirrolbencilo y triptofanilo

20 <220>  
 <221> característica miscelánea  
 <222> (21)  
 25 <223> 2-desoxiuridina modificada por un grupo hidrófobo seleccionado del grupo que consiste en bencilo, naftilo, pirrolbencilo y triptofanilo

<220>  
 <221> característica miscelánea  
 30 <222> (23)  
 <223> 2-desoxiuridina modificada por un grupo hidrófobo seleccionado del grupo que consiste en bencilo, naftilo, pirrolbencilo y triptofanilo

<220>  
 <221> característica miscelánea  
 35 <222> (27)  
 <223> 2-desoxiuridina modificada por un grupo hidrófobo seleccionado del grupo que consiste en bencilo, naftilo, pirrolbencilo y triptofanilo

40 <400> 2  
 cgctggngn naagacaacc ncnagncag gcg 33

<210> 3  
 <211> 80  
 45 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> una biblioteca de ADN monocatenario modificado (ADNmc) con una región aleatoria de 40 mer

50 <220>  
 <221> característica miscelánea  
 <222> (21) ... (60)  
 <223> región aleatoria que contiene 2-desoxiuridina modificada por un grupo naftilo

55 <400> 3

titggctggt ggtgtggctg nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 60  
 caggcggacg gtcactcata 80

60 <210> 4  
 <211> 14

- <212> ADN  
<213> Secuencia artificial
- 5 <220>  
<223> cebador inverso
- <400> 4  
tgaccgtccg cctg 14
- 10 <210> 5  
<211> 17  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial
- 15 <220>  
<223> Cebador M13
- <400> 5  
caggaaacag ctatgac 17
- 20 <210> 6  
<211> 79  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial
- 25 <220>  
<223> IR-A62F
- 30 <220>  
<221> característica miscelánea  
<222> (24) ... (25)  
<223> 2-desoxiuridina modificada por un grupo hidrófobo seleccionado del grupo que consiste en bencilo, naftilo, pirrolbencilo y triptofanilo
- 35 <220>  
<221> característica miscelánea  
<222> (31)  
<223> 2-desoxiuridina modificada por un grupo hidrófobo seleccionado del grupo que consiste en bencilo, naftilo, pirrolbencilo y triptofanilo
- 40 <220>  
<221> característica miscelánea  
<222> (35)  
<223> 2-desoxiuridina modificada por un grupo hidrófobo seleccionado del grupo que consiste en bencilo, naftilo, pirrolbencilo y triptofanilo
- 45 <220>  
<221> característica miscelánea  
<222> (37)  
<223> 2-desoxiuridina modificada por un grupo hidrófobo seleccionado del grupo que consiste en bencilo, naftilo, pirrolbencilo y triptofanilo
- 50 <220>  
<221> característica miscelánea  
<222> (41)  
<223> 2-desoxiuridina modificada por un grupo hidrófobo seleccionado del grupo que consiste en bencilo, naftilo, pirrolbencilo y triptofanilo
- 55 <220>  
<221> característica miscelánea  
<222> (45)  
<223> 2-desoxiuridina modificada por un grupo hidrófobo seleccionado del grupo que consiste en bencilo, naftilo, pirrolbencilo y triptofanilo
- 60 <220>  
<221> característica miscelánea  
<222> (45)  
<223> 2-desoxiuridina modificada por un grupo hidrófobo seleccionado del grupo que consiste en bencilo, naftilo, pirrolbencilo y triptofanilo
- 65 <220>  
<221> característica miscelánea

ES 2 899 917 T3

<222> (49)  
 <223> 2-desoxiuridina modificada por un grupo hidrófobo seleccionado del grupo que consiste en bencilo, naftilo, pirrolbencilo y triptofanilo

5 <220>  
 <221> característica miscelánea  
 <222> (55) ... (56)  
 <223> 2-desoxiuridina modificada por un grupo hidrófobo seleccionado del grupo que consiste en bencilo, naftilo, pirrolbencilo y triptofanilo

10 <400> 6  
 . tatgagtgc cgtccgcctg gcannacgca ngagncnaga nccgncagac cnaaggcnnc 60  
 agccacacca ccagccaaa 79

15 <210> 7  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> IR-A62

<220>  
 <221> característica miscelánea

25 <222> (3) .. (4)  
 <223> 2-desoxiuridina modificada por un grupo hidrófobo seleccionado del grupo que consiste en bencilo, naftilo, pirrolbencilo y triptofanilo

<220>

30 <221> característica miscelánea  
 <222> (10)  
 <223> 2-desoxiuridina modificada por un grupo hidrófobo seleccionado del grupo que consiste en bencilo, naftilo, pirrolbencilo y triptofanilo

35 <220>  
 <221> característica miscelánea  
 <222> (14)  
 <223> 2-desoxiuridina modificada por un grupo hidrófobo seleccionado del grupo que consiste en bencilo, naftilo, pirrolbencilo y triptofanilo

40 <220>  
 <221> característica miscelánea  
 <222> (16)  
 <223> 2-desoxiuridina modificada por un grupo hidrófobo seleccionado del grupo que consiste en bencilo, naftilo, pirrolbencilo y triptofanilo

45 <220>  
 <221> característica miscelánea  
 <222> (20)

50 <223> 2-desoxiuridina modificada por un grupo hidrófobo seleccionado del grupo que consiste en bencilo, naftilo, pirrolbencilo y triptofanilo

<220>  
 <221> característica miscelánea

55 <222> (24)  
 <223> 2-desoxiuridina modificada por un grupo hidrófobo seleccionado del grupo que consiste en bencilo, naftilo, pirrolbencilo y triptofanilo

<400> 7  
 60 cannacgcan gagncnagan ccgncag 27

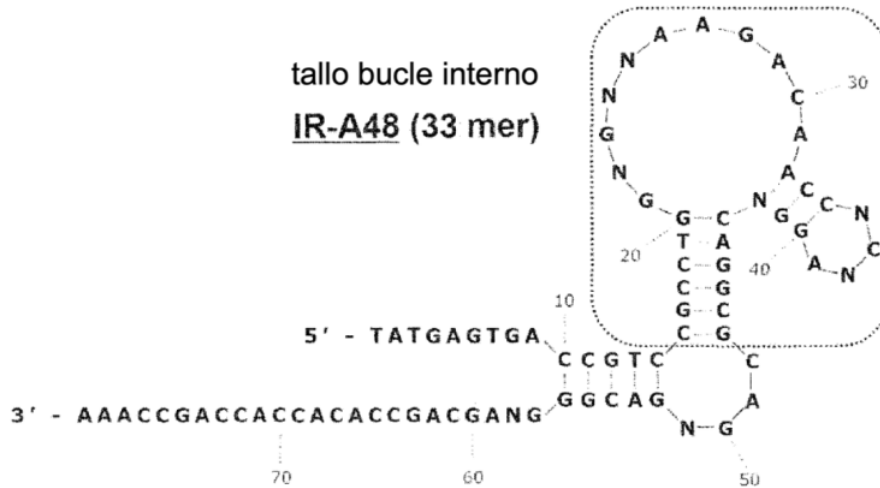
**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un aptámero para el receptor de insulina, que se une específicamente a un dominio extracelular del receptor de insulina y promueve la fosforilación del receptor de insulina, en el que el aptámero comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en:
- una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2;  
 una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 7;  
 una secuencia de nucleótidos de 33 a 80 nucleótidos consecutivos conectados a al menos un extremo de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2, que incluye esencialmente la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 en la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1, y  
 una secuencia de nucleótidos de 27 a 80 nucleótidos consecutivos conectada a al menos un extremo de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 7, que incluye esencialmente la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 7 en la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 6.
- 15 2. El aptámero para el receptor de insulina de la reivindicación 1, en el que el aptámero se une al receptor de insulina, pero no al receptor de IGF-1.
- 20 3. El aptámero para el receptor de insulina de la reivindicación 1, en el que el aptámero fosforila Y1150 del receptor de insulina o AKT S473.
4. El aptámero para el receptor de insulina de la reivindicación 1, en el que el aptámero no activa la vía MAPK.
- 25 5. El aptámero para el receptor de insulina de la reivindicación 4, en el que el aptámero fosforila el receptor de insulina, pero no causa crecimiento o división celular.
6. El aptámero para el receptor de insulina de la reivindicación 1, en el que la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 7 forma una estructura de tallo-bucle.
- 30 7. El aptámero para el receptor de insulina de la reivindicación 6, en el que el aptámero que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 se une a los receptores de insulina con una constante de disociación (Kd) de 1 a 20 nM, o en el que el aptámero que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 7 se une a los receptores de insulina con una constante de disociación (Kd) de 0,5 a 40 nM.
- 35 8. El aptámero para el receptor de insulina de la reivindicación 1, en el que al menos un nucleótido comprendido en el aptámero se modifica mediante la conexión con uno o más tipos seleccionados del grupo que consiste en PEG (polietilenglicol), biotina, idT (desoxitimidina invertida), LNA (ácido nucleico bloqueado), 2'-metoxi nucleósido, 2'-amino nucleósido, 2'-F-nucleósido, enlazador de amina, enlazador de tiol y colesterol.
- 40 9. El aptámero para el receptor de insulina de la reivindicación 1, que es un dímero o multímero.
10. Un agonista del receptor de insulina, que comprende el aptámero para el receptor de insulina de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que opcionalmente el aptámero se une al receptor de insulina pero no al receptor de IGF-1.
- 45 11. Una composición farmacéutica para su uso en la prevención o el tratamiento de una enfermedad relacionada con la insulina, comprendiendo la composición el aptámero para el receptor de insulina de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 como ingrediente activo.
- 50 12. La composición farmacéutica de la reivindicación 11, en la que la enfermedad es diabetes, complicaciones diabéticas, síndrome metabólico, obesidad o enfermedad cardiovascular, en la que opcionalmente la composición comprende además insulina.
- 55 13. Una composición para su uso en el diagnóstico de diabetes o complicaciones diabéticas, comprendiendo la composición el aptámero para el receptor de insulina de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 como ingrediente activo.

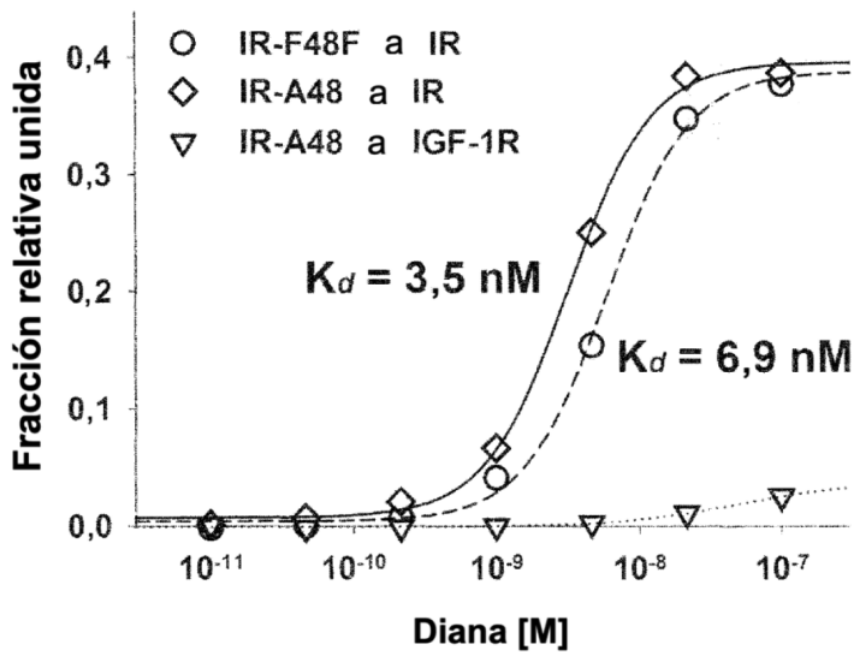




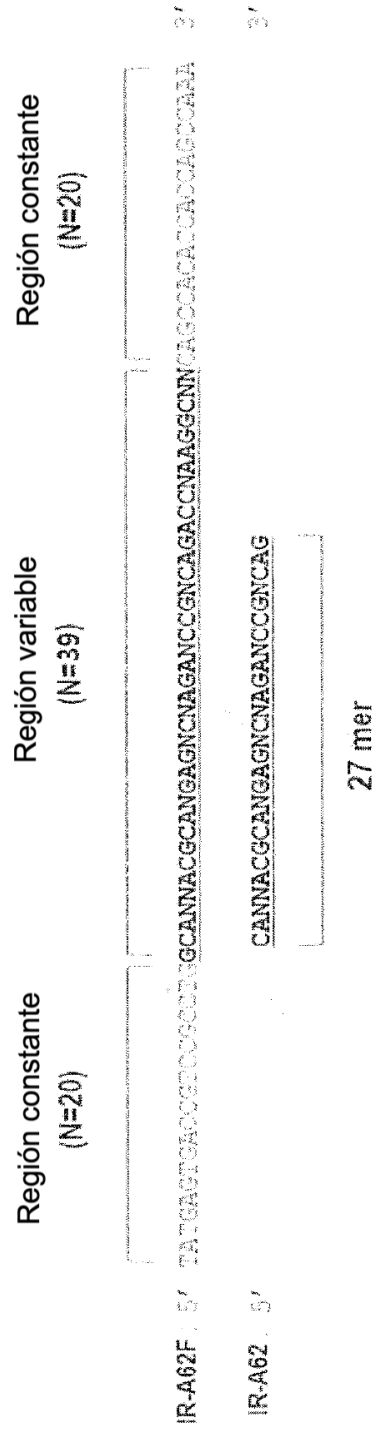
[FIG. 1b]



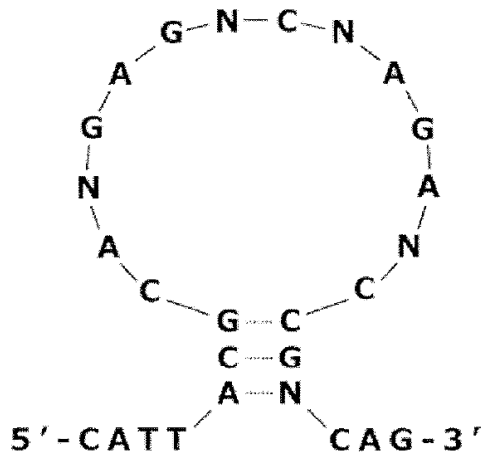
[FIG. 1c]



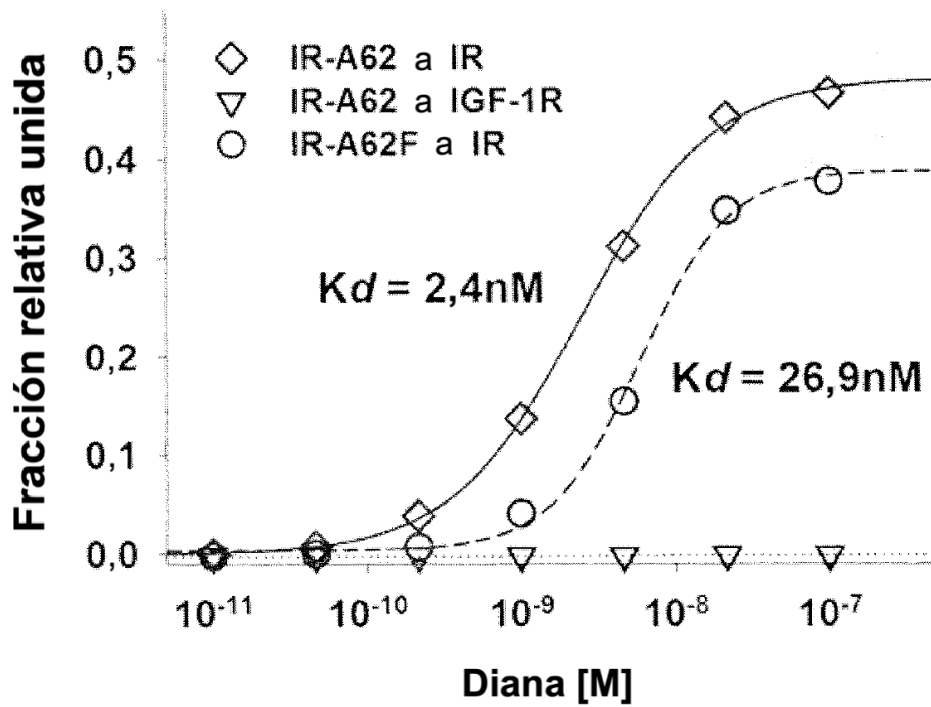
【FIG. 1d】



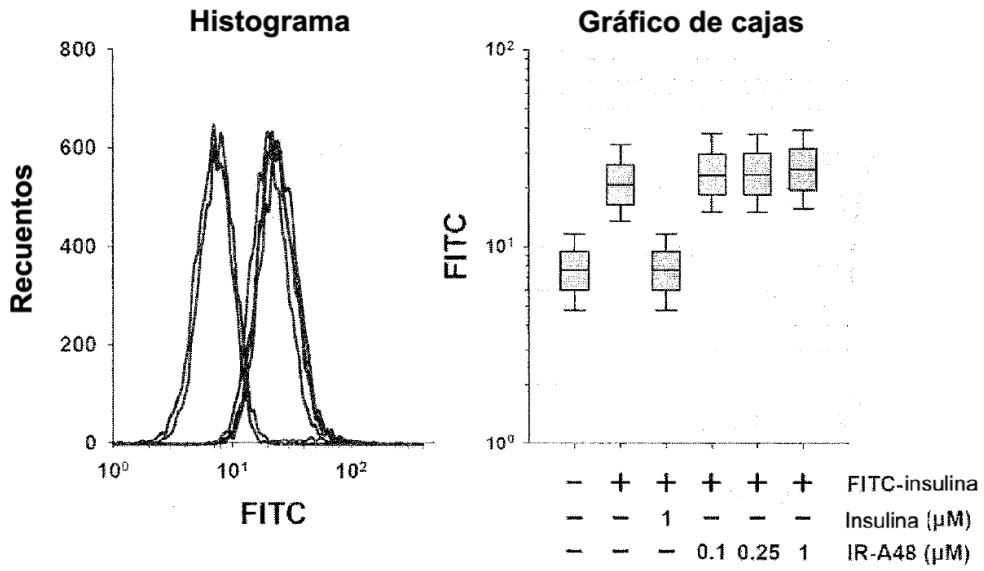
[FIG. 1e]



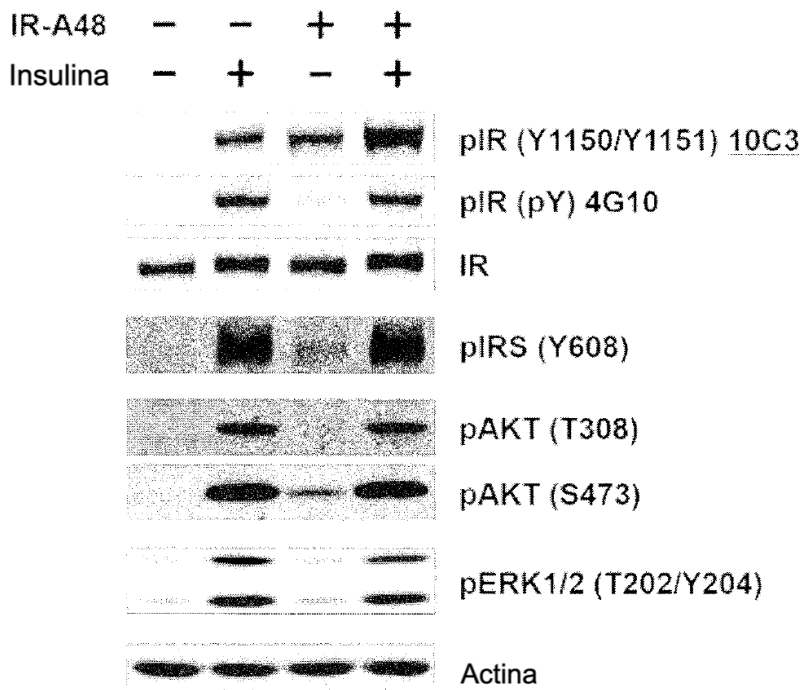
[FIG. 1f]



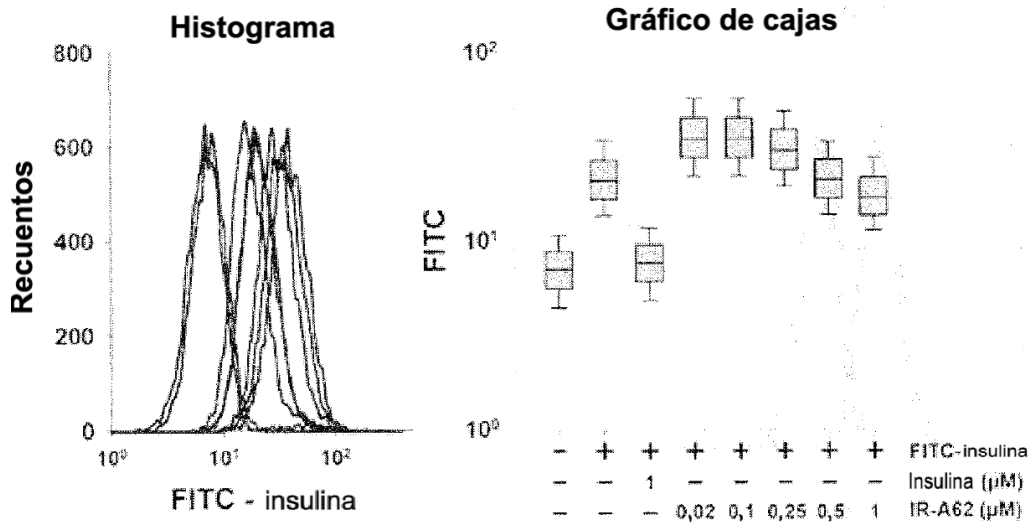
【FIG. 2a】



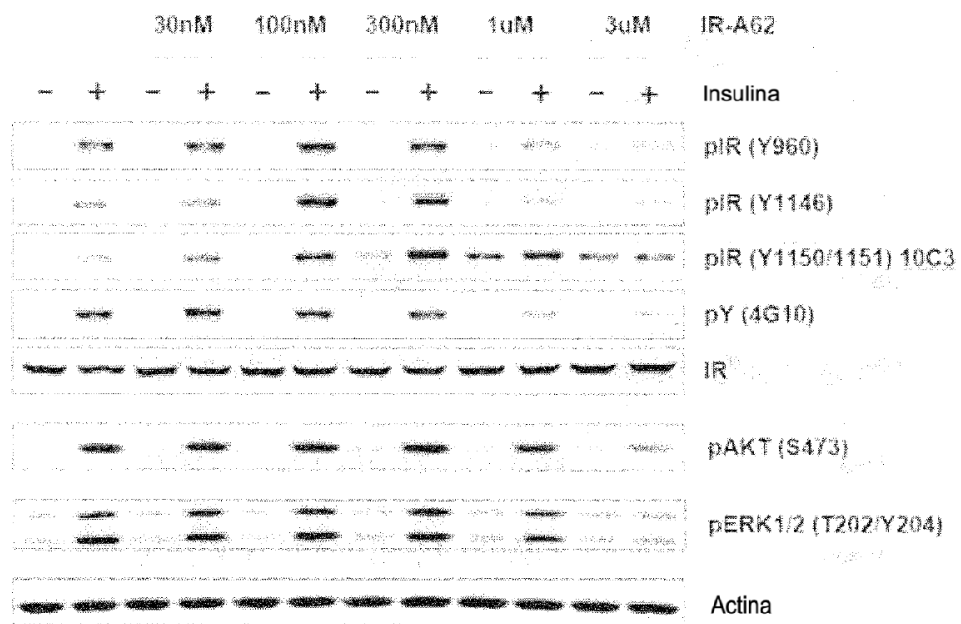
【FIG. 2b】



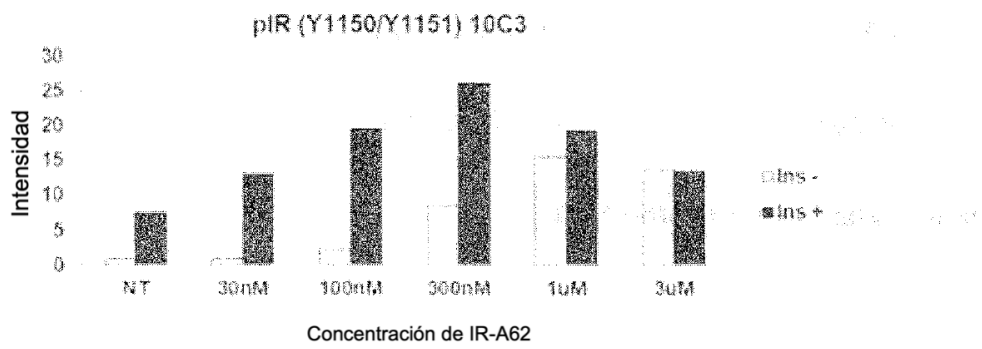
[FIG. 2c]



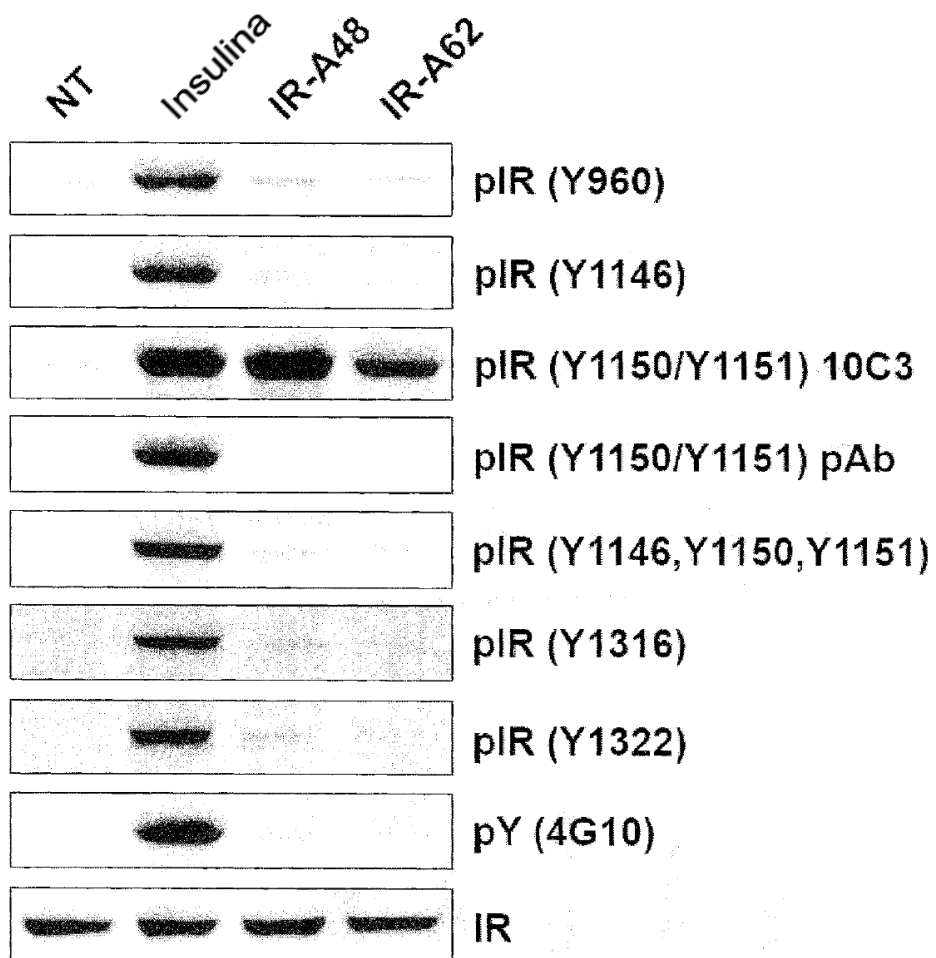
**[FIG. 2d]**



✓ Rat-1/IR  
 ✓ Insulina 50nM

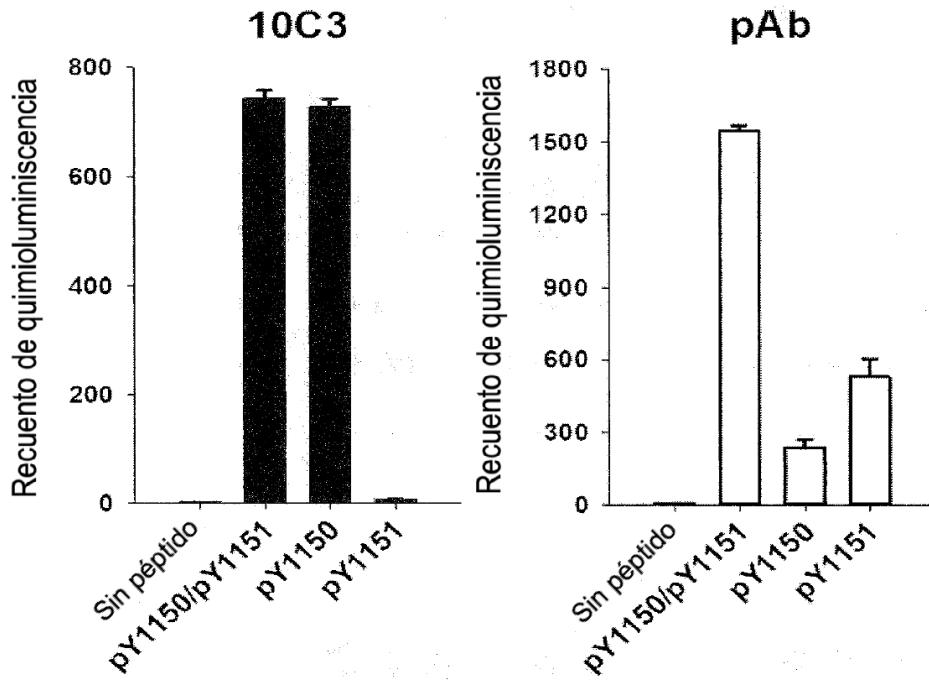


【FIG. 3a】

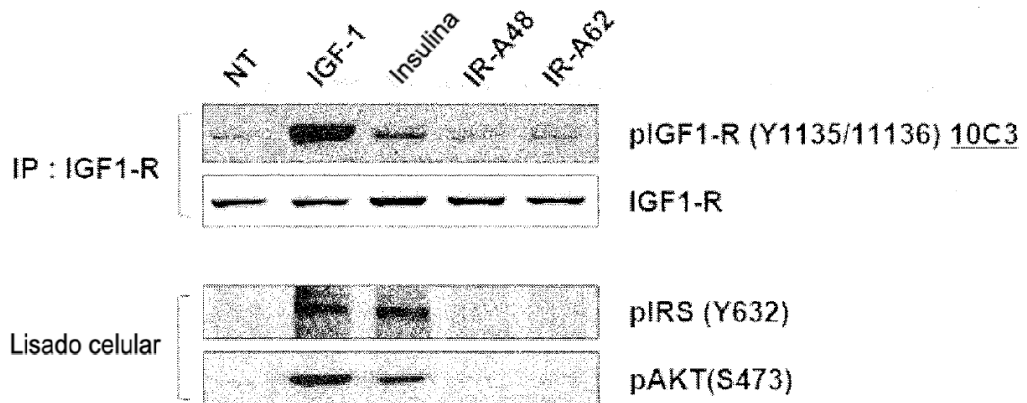




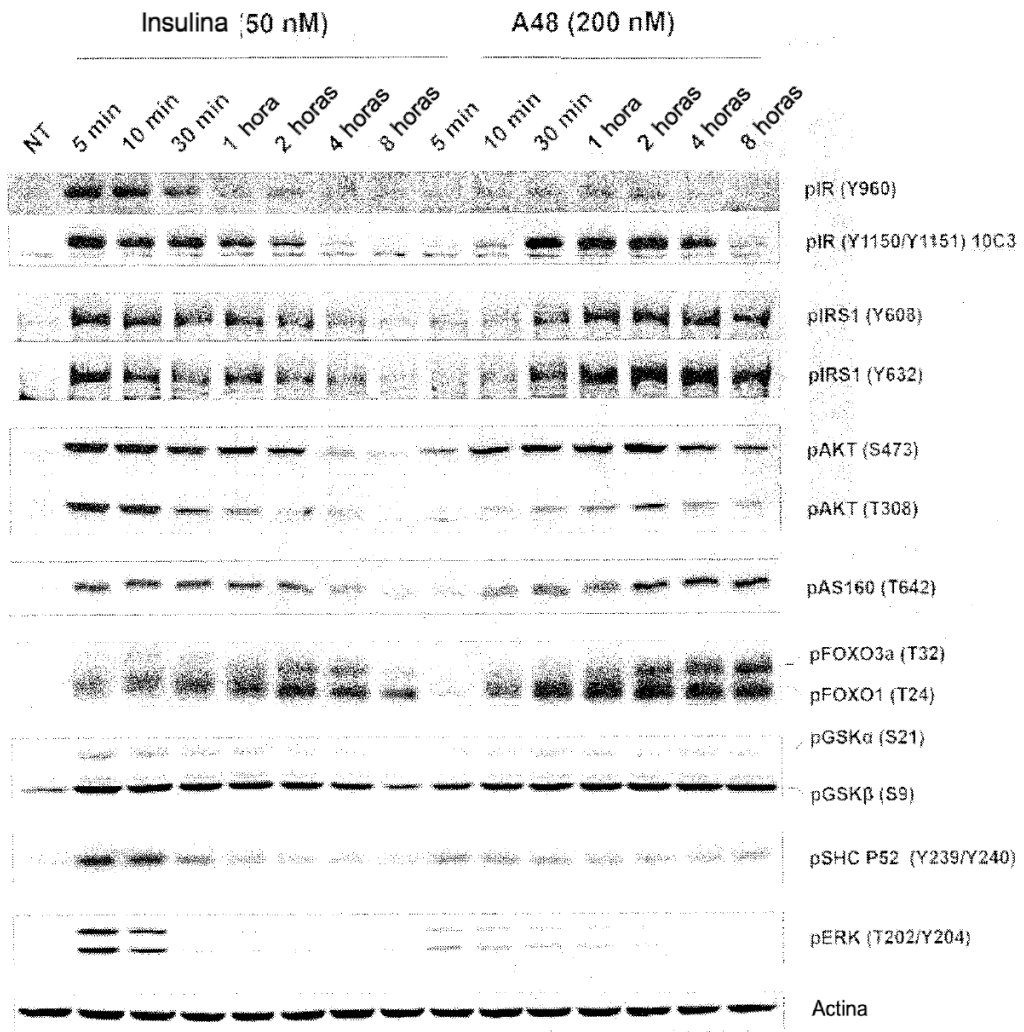
【FIG. 3b】



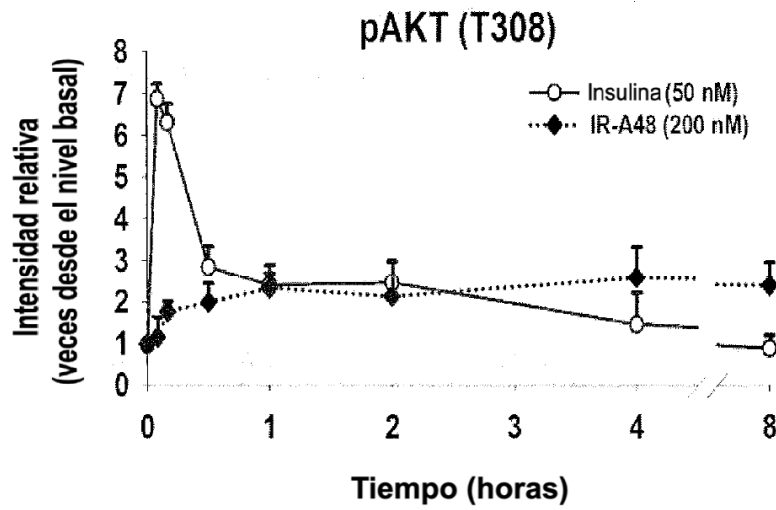
【FIG. 3c】



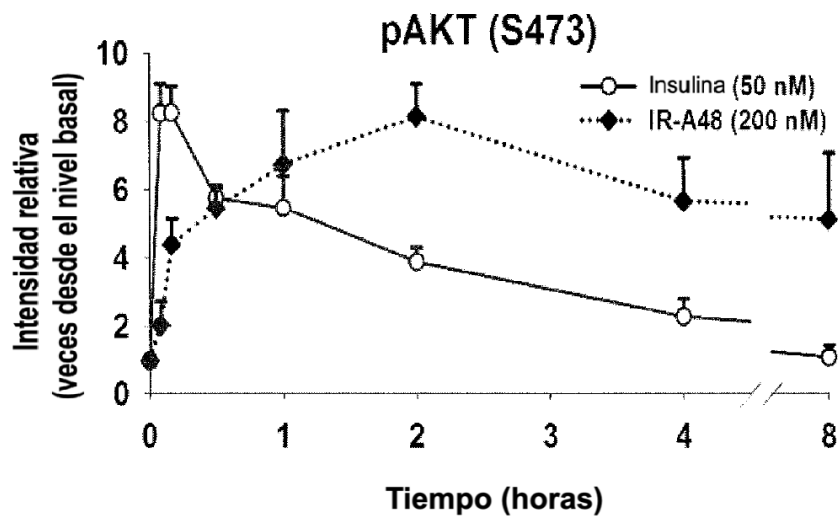
[FIG. 4a]



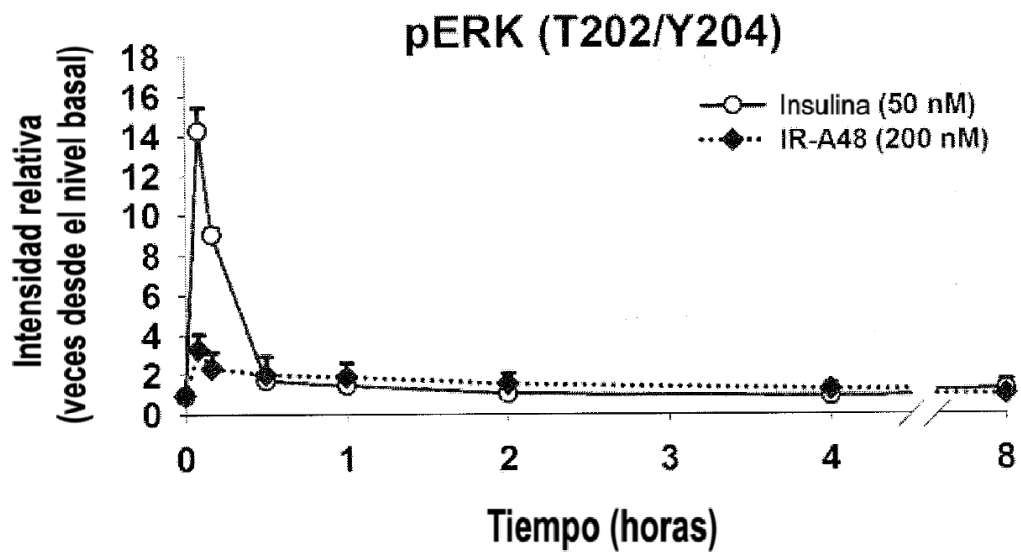
【FIG. 4b】



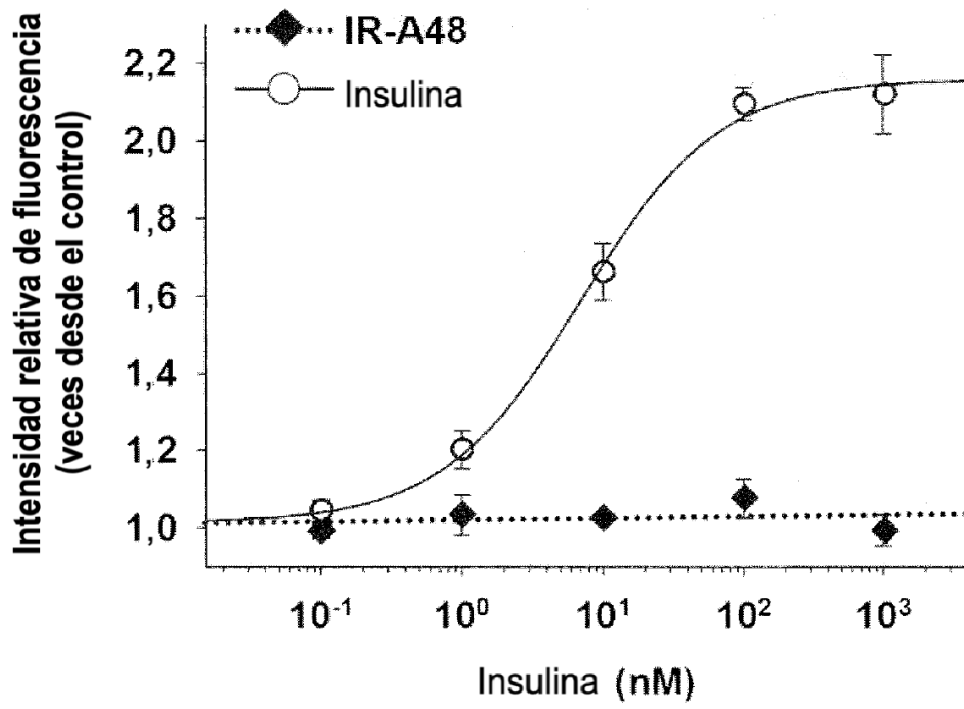
【FIG. 4c】



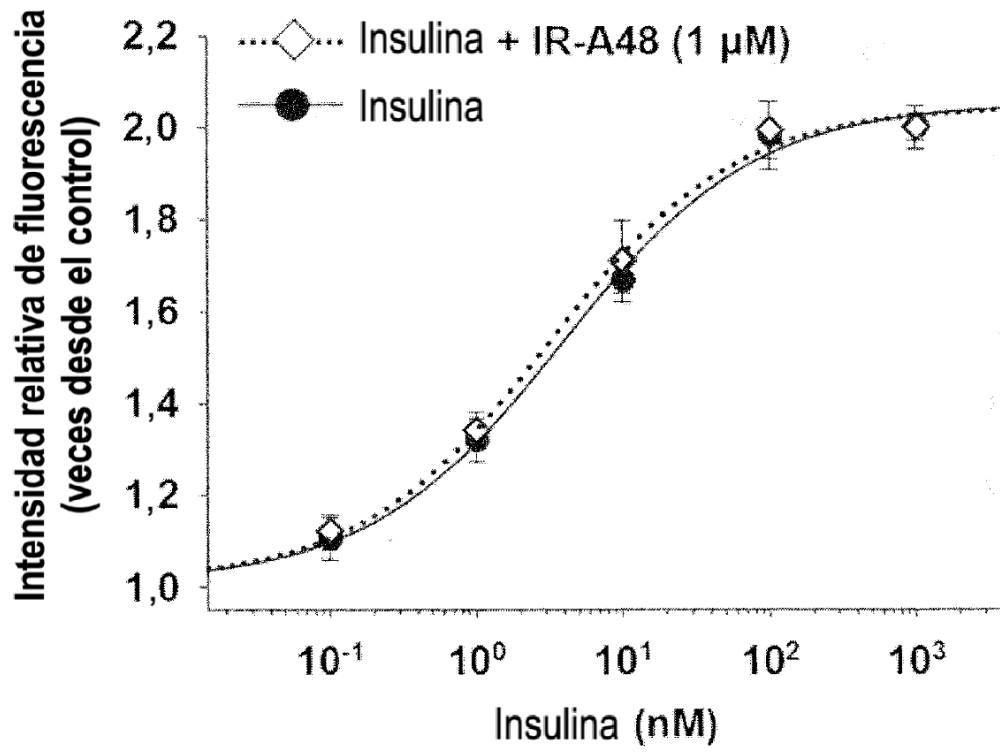
【FIG. 4d】



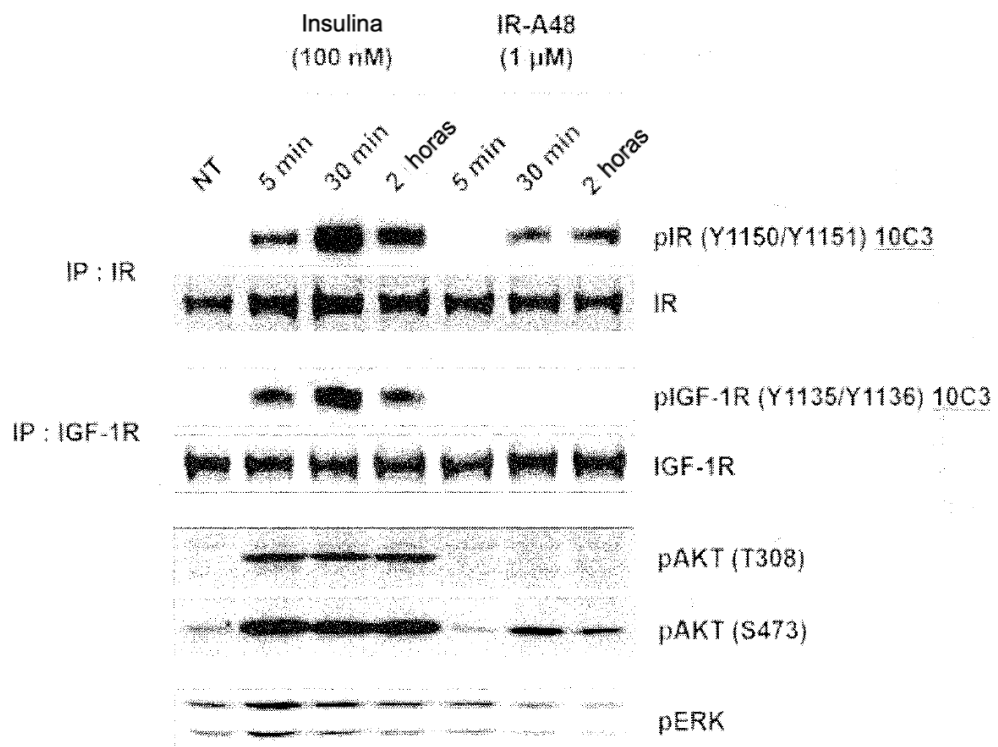
【FIG. 5a】



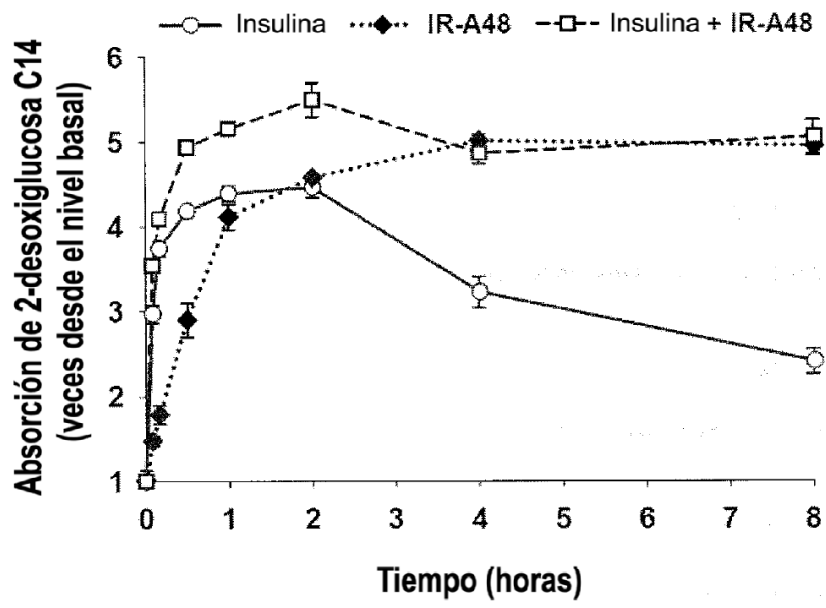
【FIG. 5b】



【FIG. 5c】

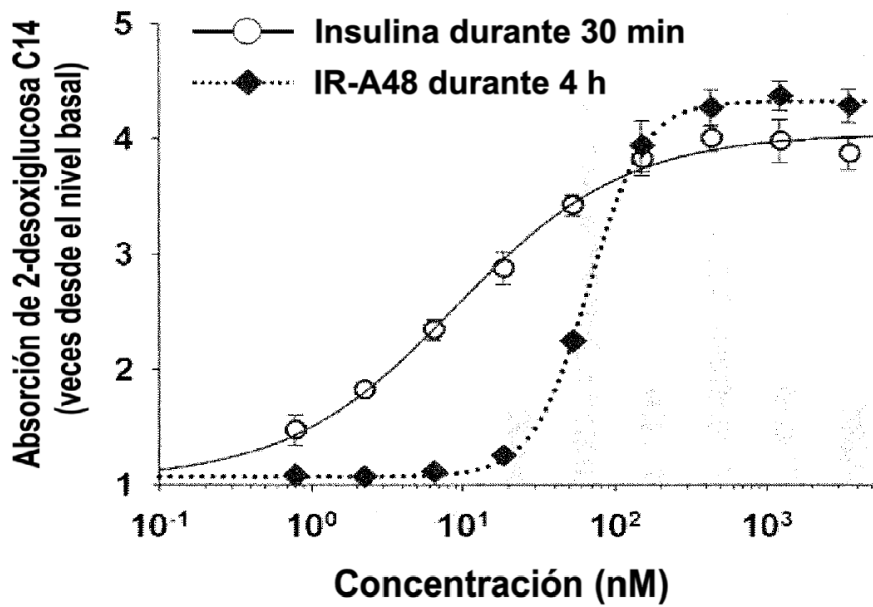


【FIG. 6a】



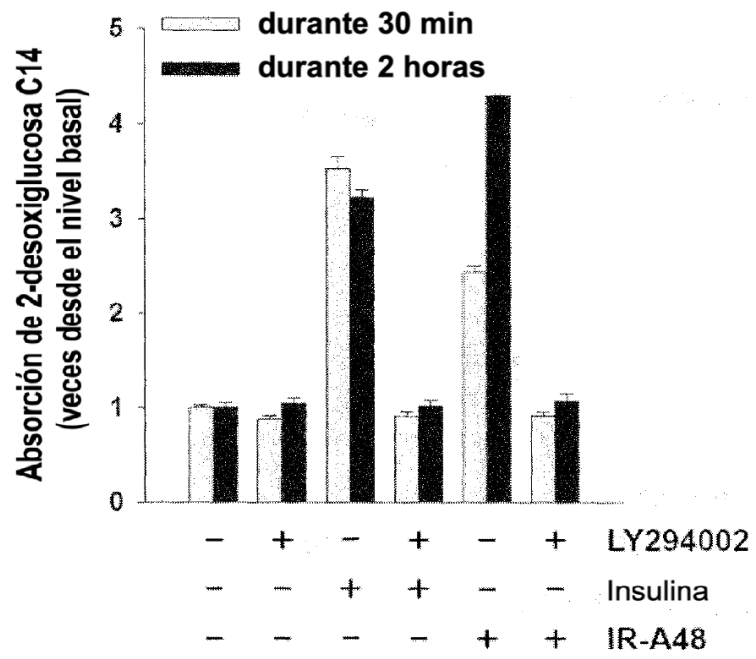


【FIG. 6b】

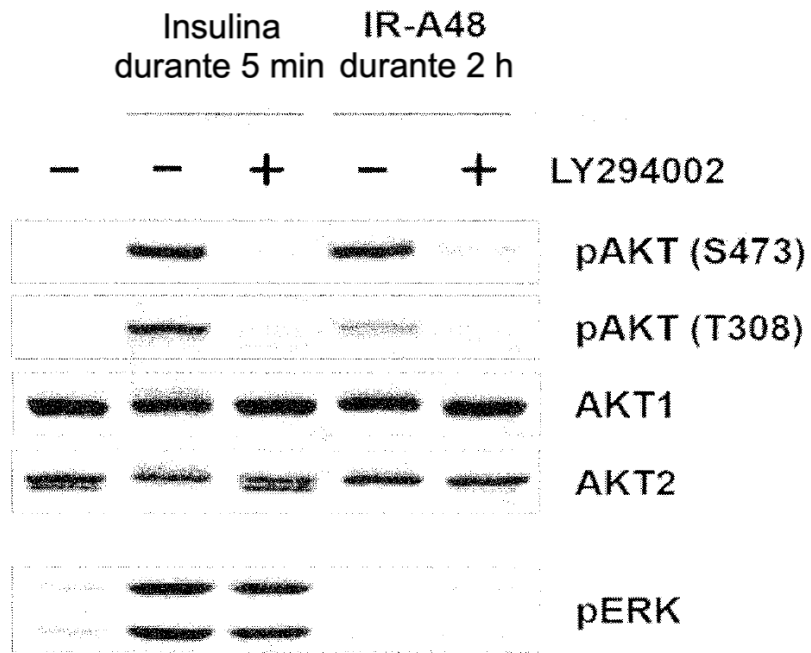


	Máx. (veces)	CE <sub>50</sub> (nM)	CE <sub>95</sub> (nM)	Coefficiente de Hill
Insulina	4,0	8,9	261,9	0,77
IR-A48	4,2	66,2	202,4	2,37

【FIG. 6c】



【FIG. 6d】



[FIG. 7]

