



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① Número de publicación: **2 356 439**

② Número de solicitud: 200802395

⑤ Int. Cl.:
C12N 15/115 (2000.01)
A61K 31/711 (2006.01)
G01N 33/569 (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫ Fecha de presentación: **07.08.2008**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **08.04.2011**

⑭ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
08.04.2011

⑰ Solicitante/s: **Fundación para la Investigación Biomédica del Hospital Universitario Ramón y Cajal Carretera Colmenar Viejo, Km. 9,100 28034 Madrid, ES**

⑱ Inventor/es: **Piñeiro del Río, David; Martín Palma, María Elena; Salinas Aracil, Matilde; Ramos Muñoz, Edurne y González Muñoz, Víctor Manuel**

⑳ Agente: **Arias Sanz, Juan**

㉑ Título: **Aptámeros específicos para histonas de *Leishmania*.**

㉒ Resumen:

Aptámeros específicos para histonas de *Leishmania*. La invención se relaciona con oligonucleótidos de cadena sencilla (aptámeros) que son capaces de unirse de forma específica a las proteínas histona de microorganismos del género *Leishmania*, así como a los usos de dichos oligonucleótidos para la diagnosis y el tratamiento de las leishmaniasis.

ES 2 356 439 A1

DESCRIPCIÓN

Aptámeros específicos para histonas de *Leishmania*.

5 **Campo técnico de la invención**

La invención se relaciona con oligonucleótidos de cadena sencilla (aptámeros) que son capaces de unirse de forma específica a las proteínas histona de microorganismos del género *Leishmania*, así como a los usos de dichos oligonucleótidos para la diagnosis y el tratamiento de las leishmaniasis.

10

Antecedentes de la invención

Leishmania es un protozoo que, en el vertebrado, desarrolla un ciclo de vida intracelular, utilizando el macrófago como célula hospedadora. Dentro de estas células, el parásito se desarrolla en los fagolisosomas donde es capaz de soportar tanto el pH ácido como la presencia de las numerosas enzimas hidrolíticas que contiene este orgánulo. Los protozoos del género *Leishmania* son el agente causante de la leishmaniasis, una enfermedad que incluye un amplio espectro de síntomas clínicos que varían desde lesiones cutáneas que curan espontáneamente hasta infecciones viscerales que pueden llegar a conducir a la muerte del paciente. Datos recientes de la OMS indican que la leishmaniasis es ahora endémica en 88 países de cinco continentes -África, Asia Europa, Norteamérica y América del Sur- con un total de 350 millones de personas con riesgo de padecerla. Se calcula que esta enfermedad afecta a más de 15.000.000 de personas en todo el mundo, localizándose su máxima incidencia en aproximadamente 15 naciones entre las que se incluyen varios países del área mediterránea. En lo que a América se refiere, se estima que cada año se producen 60.000 nuevos casos de leishmaniasis tegumentaria americana (LTA), todos ellos localizados en una región habitada por unos 59 millones de personas. Además, desde 1993, las regiones en las que la leishmaniasis es endémica se han expandido significativamente lo que está acompañado por un incremento en el número de casos registrados de la enfermedad. Además, el SIDA y otras enfermedades inmunosupresivas alimentan el riesgo de personas infectadas por *Leishmania* que desarrollan leishmaniasis visceral (WHO 2000).

Hasta el momento, los métodos de diagnóstico de la leishmaniasis se han basado en la detección de la respuesta humoral a la infección en pacientes. Así, la solicitud de patente americana US2005287176 describe un polipéptido quimérico formado por varios determinantes antigénicos de distintas proteínas de *Leishmania* dispuestos en tándem, incluyendo determinantes antigénicos de la histona 2A, de las proteínas ácidas ribosomales LiP2 y LiP2b, así como de la proteína ribosomal PO. La solicitud de patente internacional WO2005044301 describe la secuencia de histona 2A y sugiere su uso para la identificación de anticuerpos en suero de pacientes. La solicitud de patente europea EP0997734 describe un método diagnóstico para la diagnosis de la leishmaniasis visceral en el que se investiga la aglutinación de un preparado de promastigotes de *Leishmania* tripsinizados y teñidos con azul brillante de Coomassie tras su adición a una muestra de suero.

Sin embargo, estos ensayos son dependientes de la aparición de una respuesta humoral en el paciente. Por ello, este tipo de ensayos no resultan de utilidad para la detección de muchas las leishmaniasis humanas, ya que estas ocurren fundamentalmente en individuos inmunodeprimidos, que no desarrollan una respuesta humoral completa. Por otro lado, es frecuente que aparezcan animales que desarrollan los signos de la enfermedad pero en los que el título de anticuerpos no es lo suficientemente alto como para que los anticuerpos puedan ser detectados.

Por ello, es necesario disponer de ensayos que permitan detectar el parásito en sí en lugar de ensayos dirigidos a detectar la presencia de la respuesta humoral en el paciente. Sin embargo, este tipo de ensayos se enfrenta al problema de que no existen anticuerpos comerciales contra muchos de los antígenos de *Leishmania*. La solicitud de patente EP0819766 describe varios polinucleótidos de *Leishmania* que pueden servir de base para su detección en muestras mediante la amplificación mediante PCR usando cebadores específicos así como para distinguir distintas especies de *Leishmania*. La solicitud de patente ES216996 describe un método para la detección de *L. infantum* mediante la amplificación por PCR de un marcador específico del kinetoplasto seguido de la detección mediante ELISA del amplicón generado en la PCR. Por otro lado, Moreno, M. *et al.* (Biochem. Biophys. Res. Commun., 2003, 308:214-218) han descrito aptámeros de ADN específicos para la proteína KMP-11 de *L. infantum* y han sugerido su posible uso como herramienta diagnóstica. Sin embargo, existe aún una necesidad en la técnica de proporcionar métodos adicionales para el diagnóstico de la leishmaniasis y, más concretamente, de agentes capaces de unirse a antígenos de *Leishmania* con la suficiente rapidez y afinidad como para poder ser utilizados con fines diagnósticos.

Compendio de la invención

La presente invención se basa en la identificación por parte de los inventores de aptámeros de *Leishmania* que son capaces de unirse a la proteína histona 2A con alta afinidad, de forma que permiten la detección específica de dicha proteína sin mostrar ninguna reactividad cruzada con la histona 2A de especies en las que *L. infantum* habitualmente se hospeda, abriendo la puerta a un método alternativo para la diagnosis de la leishmaniasis.

En un primer aspecto, la invención se relaciona con un ácido nucleico de cadena sencilla que es capaz de unirse específicamente a una histona de un organismo perteneciente al género *Leishmania*.

ES 2 356 439 A1

En otro aspecto, la invención se relaciona con un aptámero definido por la fórmula

5'-GCGGATGAAGACTGGTGT-X-GCCCTAAATACGAGCAAC-3'

5 en donde X es un oligonucleótido seleccionado del grupo de SEQ ID NO: 8 a 14 o una variante funcionalmente equivalente del mismo o bien que comprende una secuencia seleccionada del grupo de SEQ ID NO: 1 a 7 o una variante funcionalmente equivalente de la misma.

10 En otro aspecto, la invención se relaciona al uso de al menos un aptámero de la invención para la detección de *Leishmania*.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método de diagnóstico de una infección por *Leishmania* que comprende

15

- (i) poner en contacto una muestra biológica de un paciente con al menos un aptámero de la invención y
- (ii) detectar la unión entre el aptámero y la muestra la cuál es indicativa de la presencia de *Leishmania* en la muestra.

20

En otro aspecto, la invención se relaciona con un aptámero o una mezcla de aptámeros de la invención para su uso en medicina.

25 En otro aspecto, la invención se relaciona con una composición farmacéutica que comprende al menos un aptámero según la invención opcionalmente en combinación con uno o más soportes, excipientes o solventes farmacéuticamente aceptables.

30 En otro aspecto, la invención se relaciona con el uso de al menos un aptámero de la invención para la preparación de un medicamento para el tratamiento de una infección por *Leishmania*.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método para la identificación de aptámeros específicos para una histona de un organismo del género *Leishmania* que comprende

35

- (i) poner en contacto una histona de una especie del género *Leishmania* o un fragmento peptídico de la misma con una biblioteca de oligonucleótidos de ADN,
- (ii) seleccionar aquellos miembros de la biblioteca de oligonucleótidos ADN que se unen específicamente a dicha histona o péptido y
- (iii) amplificar los oligonucleótidos que se han seleccionado en la etapa (ii) para obtener una población enriquecida de oligonucleótidos que se unen a la histona o péptido y
- (iv) opcionalmente, repetir las etapas (i) a (iii) una o más veces usando como material de partida en la etapa (i) la población enriquecida obtenida en la etapa (iii).

45

Breve descripción de las figuras

50 La figura 1 muestra la secuencia de los 7 clones recuperados del screening mediante SELEX de la biblioteca de oligonucleótidos por afinidad frente a H2A. La gráfica muestra el porcentaje de cada uno de los nucleótidos, piridinas o pirimidinas en los aptámeros definidos por las secuencias SEQ ID NO: 1 a 7. Las secuencias consisten en 76 nucleótidos que están formados por las regiones constantes en las posiciones 5' y 3', indicados en negrita y que se muestran únicamente para la primera secuencia, y las secuencias variables centrales que se muestran para todos los aptámeros. Los dinucleótidos CG se han subrayado.

55

La figura 2 muestra una titulación mediante ELONA en donde se compara la sensibilidad de los aptámeros de la tercera ronda de selección (rd3) y del aptámero LiAPT1 para la detección de H2A recombinante.

60 La figura 3 muestra la cinética de unión de la población de aptámeros obtenida tras la tercera ronda de selección y del aptámero LiAPT1 mediante ensayos ELONA de unión a la proteína H2A recombinante.

La figura 4 muestra un ensayo de unión de los aptámeros LiAPT1 y LiAPT2 a cantidades crecientes de histona H2A recombinante y de BSA mediante slot blot.

65 La figura 5 muestra una inmunotransferencia de lisados totales de promastigotes de *L. infantum* (carriles T), sobrenadantes citosólicos (carriles C) o fracciones nucleares (carriles N) o la proteína H2A recombinante (carriles R). Las membranas se han incubado con los aptámeros LiAPT1 y LiAPT2 marcados con digoxigenina y visualizadas con un anticuerpo anti-digoxigenina marcado con peroxidasa y un kit de quimioluminiscencia.

La figura 6 muestra los resultados del mapeo de sitios de unión en H2A a los aptámeros LiAPT1 y LiAPT2. A. Secuencia de los 9 péptidos que cubren la totalidad de la secuencia de *L. infantum* H2A con un solapamiento de 5 amino ácidos en los extremos amino y carboxilo terminales. B. Estudios de unión mediante ELONA de los péptidos #1 a #9 y de la proteína H2A recombinante con la población de aptámeros obtenidos tras la tercera ronda de selección (barras blancas), con el aptámeros LiAPT1 (barras negras) y con el aptámero LiAPT2 (barras blancas). C identificación en el modelo de estructura tridimensional de H2A de la posición de los péptidos #8 y #5.

Descripción detallada de la invención

En un primer aspecto, la invención proporciona un aptámero que comprende un ácido nucleico de cadena sencilla que es capaz de unirse específicamente a una histona de una especie del género *Leishmania*.

Por aptámero se entiende cualquier molécula consistente en un ADN de cadena sencilla que sea capaz de unirse de forma específica a un sustancia diana. Por específico se entiende un aptámero capaz de unirse a una histona de una especie del género *Leishmania* sin unirse substancialmente a otras proteínas del parásito o a las histonas de los organismos que actúan como hospedadores de *Leishmania*, incluyendo, las histonas humanas, caninas, bovinas o de roedores.

Los aptámeros objeto de la presente pueden usarse para la detección de cualquier especie de *Leishmania*, incluyendo *Leishmania aethiopica*, *Leishmania amazonensis*, *Leishmania arabica*, *Leishmania archibaldo*, *Leishmania aristedesi*, *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania chagasi* (syn. *Leishmania infantum*), *Leishmania (Viannia) colombiensis*, *Leishmania deanes*, *Leishmania donovani*, *Leishmania enriettii*, *Leishmania equatorensis*, *Leishmania forattinii*, *Leishmania garnhami*, *Leishmania gerbili*, *Leishmania (Viannia) guyanensis*, *Leishmania herreri*, *Leishmania hertigi*, *Leishmania infantum*, *Leishmania killicki*, *Leishmania (Viannia) lainsoni*, *Leishmania major*, *Leishmania mexicana*, *Leishmania (Viannia) naiffi*, *Leishmania (Viannia) panamensis*, *Leishmania (Viannia) peruviana*, *Leishmania (Viannia) pifanoi*, *Leishmania (Viannia) shawi*, *Leishmania tarentolae*, *Leishmania trópica*, *Leishmania turanica*, *Leishmania venezuelensis*. En una forma preferida de la invención, los aptámeros se unen específicamente a una histona de *L. infantum*.

Los aptámeros objeto de la presente invención tienen la capacidad de unirse a distintas histonas de organismos del género *Leishmania*, en particular, a las histonas H1, H2A, H2B, H3 y H4. En una forma preferida de la invención, los aptámeros se unen específicamente a las histonas H2A y H3. En una forma aún más preferida de la invención, los aptámeros se unen específicamente a la histona H2A. Los aptámeros son capaces de unirse específicamente a las histonas en su forma nativa así como a las variantes de las mismas que resultan de su modificación post-traduccional, incluyendo las variantes metiladas, acetiladas, fosforiladas, ubiquitinadas, sumoiladas, citrulinadas y ADP-ribosiladas.

En una forma de realización preferida, los aptámeros se unen específicamente a la histona H2A de *L. infantum*.

Los aptámeros objeto de la presente invención son moléculas de ácido nucleico de cadena sencilla e incluyen moléculas de ADN y ARN, así como variantes de las mismas que han sido modificadas con objeto de mejorar la resistencia de las moléculas a las nucleasas del organismo. Dichas modificaciones incluyen modificaciones en los nucleótidos así como modificaciones en los enlaces fosfodiéster.

Modificaciones en los nucleótidos incluyen modificaciones en los restos de purina o pirimidina y modificaciones en los restos de ribosa o desoxirribosa. Modificaciones adecuadas en el contexto de la presente invención incluyen nucleótidos modificados con arabinosa, según se ha descrito en WO2007/038869 así como nucleótidos que presentan en posición 2' del azúcar un substituyente seleccionado del grupo de fluoro, hidroxilo, amino, azido, alquilo, alcoxi y alcoxilquilo. En otra forma de realización de la invención, el grupo alquilo se selecciona del grupo metilo, etil, propil, butil o un grupo alquilo funcionalizado como etilamino, propilamino y butilamino. Alternativamente, el grupo alcoxi es metoxi, etoxi, propoxi o un grupo alcoxi funcionalizado según la fórmula $-Q(CH_2)_q-R$, donde q es de 2 a 4 y Resun grupo amino, metoxi o etoxi. Grupos alcoxilquilo adecuados son metoxietilo y etoxietilo. También forman parte de la invención aptámeros en los que distintos nucleótidos contienen distintas modificaciones en posición 2'.

En otra forma de realización, los aptámeros contienen enlaces modificados tales como enlaces tipo fosfodiéster, fosfortriéster, fosfortioato, fosforoditioato, fosforoselenoato, fosforodiselenoato, fosforoanilitioato, fosforoamidato, metilfosfonato, boranofosfonato así como combinaciones de los mismos o bien son péptidos ácidos nucleicos (Ppeptide nucleic acids, PNA), en los que los distintos nucleótidos están unidos por enlaces amida.

En otra forma de realización, los aptámeros pueden estar conjugados a una molécula con el fin de modificar las propiedades farmacocinéticas del aptámero y aumentar la vida media en el organismo. En una forma preferida de la invención, los aptámeros están conjugados a polímeros del tipo de la carboximetilcelulosa, el quitosano, el dextrano o el polietilenglicol (PEG), preferiblemente a polímeros de éste último que tienen entre 10 y 80 kDa de tamaño y, en particular, al menos 10, 20, 30, 40, 50, 60, o 80 kDa de tamaño.

En una forma de realización preferida, los aptámeros de la invención son moléculas de ADN. En otra forma de realización, los aptámeros de la invención comprenden la secuencia

5'-GCGGATGAAGACTGGTGT-X-GCCCTAAATACGAGCAAC-3'

ES 2 356 439 A1

en donde X es un oligonucleótido seleccionado del grupo de SEQ ID NO: 8 a 14 o una variante funcionalmente equivalente del mismo. Preferiblemente, los aptámeros de la invención comprenden una secuencia seleccionada del grupo de SEQ ID NO: 1 a 7 o una variante funcionalmente equivalente de los mismos. Por variante funcionalmente equivalente se entiende cualquier aptámero que se derive de los oligonucleótidos anteriormente mencionados mediante la sustitución, adición o delección de uno más nucleótidos y que conserve esencialmente intactas las propiedades de unión a las histonas de *Leishmania*. Métodos para establecer si un aptámero es funcionalmente equivalente a los aptámeros de la invención son, por ejemplo, el método ELONA tal y como se describe en el ejemplo 4, mediante slot blot tal y como se describe en el ejemplo 5, mediante inmunotransferencia tal y como se describe en el ejemplo 7 o mediante cualquier otro método conocido en la técnica para detectar la unión de un compuesto a otro.

Los aptámeros objeto de la invención son capaces de unirse específicamente a la histona H2 de *Leishmania* sin mostrar reactividad cruzada substancial ni con otras proteínas de *Leishmania* ni con las histonas de los organismos que actúan como hospedadores de *Leishmania*, de forma que es posible usar los aptámeros de la invención para detectar la presencia de *Leishmania* en una muestra que se sospecha puede contener dicho parásito. Por ello, en otro aspecto, la invención se relaciona con el uso de un aptámero tal que definido en las reivindicaciones 1 a 6 o una mezcla de dichos aptámeros en un método para la detección de *Leishmania*.

La detección de *Leishmania* puede llevarse a cabo usando cualquier método de los conocidos en la técnica para detectar la unión de un compuesto a otro. Así, el uso de los aptámeros según la invención puede llevarse a cabo mediante ELONA (enzyme linked oligonucleotide assay), tal y como se ha descrito en US5789163, slot blot, western blot, etc. El uso de los aptámeros para la detección de *Leishmania* requiere del mareaje de los aptámeros con moléculas que puedan ser detectadas subsecuentemente bien porque contienen grupos detectables directamente ((por ejemplo, fluoresceína, rodamina, ficoeritrina, cumarina, oxazina, resorufina, cianina y derivados de los mismos), grupos luminiscentes, nanopartículas Qdot™), mediante el uso de compuestos específicos para la molécula usada como marcador (hapteno o antígeno/anticuerpos, biotina/estreptavidina, azúcar/lecitina, enzima/cofactor, ligando receptor) o mediante mareaje con enzimas que catalizan reacciones con sustratos fluorogénicos, luminogénicos o cromogénicos. Si se usa una enzima, entonces esta enzima debe ser capaz de generar una señal detectable, por ejemplo, tras la adición de un activador, sustrato, agente amplificador y similares. Las enzimas que son adecuadas para el mareaje de los aptámeros de acuerdo con la presente invención y los sustratos correspondientes incluyen:

- Fosfatase alcalina:
 - Sustratos cromogénicos: sustratos basados en fosfato de p-nitrofenilo (p-NPP), fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indolilo/nitroazul de tetrazolio (BCIP/NBT), Fast-Red/fosfato de naftol-AS-TS
 - Sustratos fluorogénicos: fosfato de 4-metilumbeliferilo (4-MLJP), 2-(5'-cloro-2'-fosforiloxifenil)-6-cloro-4-(3H)-quinazolinona (CPPCQ), difosfato de 3,6-fluoresceína (3,6-FDP), sales diazónicas de Fast Blue BB, Fast Red TR, o Fast Red Violet LB.
- Peroxidasas:
 - Sustratos cromogénicos basados en ácido 2,2-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS), o-fenilenediamina (OPT), 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB), o-dianisidina, ácido 5-aminosalicílico, ácido 3-dimetilaxninobenzoico (DMAB) y 3-metil-2-benzotiazolinahidrazona (MBTH), 3-amino-9-etilcarbazol (AEC) y tetrahidrocloruro de 3,3'-diaminobenzidina (DAB).
 - Sustratos fluorogénicos: ácido 4-hidroxi-3-metoxifenilacético, fenoxazinas reducidas, benzotiazinas reducidas, incluyendo el reactivo Amplex® Red, Amplex UltraRed e dihidroxantenos reducidos.
- Glicosidasas:
 - Sustratos cromogénicos: o-nitrofenil- β -D-galactósido (0-NPG), p-nitrofenil- β -D-galactósido y 4-metilumbeliferil- β -D-galactósido (MUG) para la β -D-galactosidasa.
 - Sustratos fluorogénicos: resorufina β -D-galactopiranosido, fluoresceína digalactósido (FDG), fluoresceína diglucurónido, 4-metilumbeliferil- β -D-galactopiranosido, carboxiumbeliferil- β -D-galactopiranosido y cumarina β -D-galactopiranosidos fluorinados.
- Oxidoreductasas (luciferasa):
 - Sustratos luminiscentes: luciferina.

Alternativamente, los aptámeros pueden ser conjugados a nanopartículas fluorescentes para aumentar la sensibilidad de la detección (Smith, J.E. *et al.* Anal. Chem. 79:3075-3082).

ES 2 356 439 A1

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método de diagnóstico de una infección por *Leishmania* que comprende

- (i) poner en contacto una muestra biológica de un paciente con al menos un aptámero de acuerdo a la invención y
- (ii) detectar la unión entre el aptámero y la muestra

donde una interacción entre el aptámero y la muestra es indicativa de que la presencia de *Leishmania* en la muestra.

En principio, cualquier muestra biológica que contenga cierto nivel de carga parasitaria puede ser usada en el método diagnóstico de acuerdo a la invención e incluyen fluidos biológicos (sangre periférica, suero, plasma, orina, líquido sinovial, líquido cefalorraquídeo), el raspado o exudado de una lesión cutánea, biopsias de bazo o nódulo linfático.

Es conocido que los aptámeros son capaces no sólo de unirse a la molécula diana sino que también pueden provocar alteraciones estructurales en las mismas que pueden resultar en la pérdida de actividad de las moléculas diana o puede interferir con la interacción de la proteína diana con otras proteínas en la células (por ejemplo, en el caso de la histona H2A, las aptámeros de la invención podrían bloquear la capacidad de la histona H2A de unirse al resto de componentes que forman el nucleosoma). Por ello, y teniendo en cuenta el papel esencial de las histonas para la viabilidad celular, los aptámeros de la presente invención tienen utilidad también como agentes terapéuticos para el tratamiento y prevención de todas aquellas enfermedades causadas por una infección por *Leishmania*. Así, en otro aspecto, la invención se relaciona con los aptámeros de la invención o mezclas de varios aptámeros para su uso en medicina así como a composiciones farmacéuticas que comprenden al menos un aptámero de la invención y, opcionalmente, uno o más soportes, excipientes o solventes farmacéuticamente aceptables.

Para uso en medicina, los compuestos y combinaciones de compuestos de la invención pueden ser formulados conjuntamente con un excipiente que es aceptable desde el punto de vista farmacéutico. Excipientes preferidos para su uso en la presente invención incluyen azúcares, almidones, celulosas, gomas y proteínas. En una realización particular, la composición farmacéutica de la invención se formulará en una forma farmacéutica de administración sólida (p.ej., comprimidos, cápsulas, grageas, gránulos, supositorios, etc.) o líquida (p.ej., soluciones, suspensiones, emulsiones, etc.). En otra realización particular, las composiciones farmacéuticas de la invención pueden ser administradas por cualquier ruta, incluyendo, sin ser limitante, oral, intravenosa, intramuscular, intrarterial, intramedular, intratecal, intraventricular, transdérmica, subcutánea, intraperitoneal, intranasal, entérica, tópica, sublingual o rectal. Una revisión de las distintas formas de administración de principios activos, de los excipientes a utilizar y de sus procedimientos de fabricación puede encontrarse en el Tratado de Farmacia Galénica, C. Faulí i Trillo, Luzán 5, S.A. de Ediciones, 1993.). Las dosis y regímenes de administración pueden ser determinados empíricamente por el experto mediante métodos ampliamente conocidos.

En principio, todo tipo de enfermedades causadas por una infección por *Leishmania* son susceptibles de ser tratadas usando el método de acuerdo a la invención. Así, en una forma de realización preferida, los aptámeros de la invención se utilizan para el tratamiento de la leishmaniasis visceral o kala-azar, la leishmaniasis cutánea o la leishmaniasis mucocutánea.

Los autores de la presente invención han identificado una de las regiones de la histona H2A de *L. infantum* que se une a los aptámeros LiAPT1 y LiAPT2. Dicha región se extiende entre los amino ácidos 61 a 80 (la región definida por el péptido 5 según la figura 6). Sin embargo, estudios similares de mapeo peptídico realizados por Soto *et al.* (Immunology Letters, 1995, 48:209-214) demostraron que sueros aislados de poros enfermos de Leishmaniosis reconocían casi de forma exclusiva la regiones N-terminal y C-terminal de la histona H2A de *L. infantum*, pero no la región localizada entre los amino ácidos 61 a 80, lo que implica que existe una región en la histona H2A que es capaz de seleccionar aptámeros que se unen específicamente a ella pero que es incapaz de actuar como inmunógena *in vivo*. La identificación de las regiones mínimas en la histona H2A para la selección y unión de aptámeros abre la puerta para el uso de dichas regiones mínimas para la identificación de aptámeros, con la consiguiente ventaja económica dado que no es necesario usar la proteína completa. Así, en otro aspecto, la invención se relaciona con un método para la identificación de aptámeros específicos para una histona de un organismo del género *Leishmania* que comprende

- (i) poner en contacto una histona de una especie del género *Leishmania* o un fragmento peptídico de la misma con una biblioteca de oligonucleótidos de ADN,
- (ii) seleccionar aquellos miembros de la biblioteca de oligonucleótidos ADN que se unen específicamente a dicha histona o péptido y
- (iii) amplificar los oligonucleótidos que se han seleccionado en la etapa (ii) para obtener una población enriquecida de oligonucleótidos que se unen a la histona o péptido y
- (iv) opcionalmente, repetir las etapas (i) a (iii) una o más veces usando como material de partida en la etapa (i) la población enriquecida obtenida en la etapa (iii).

ES 2 356 439 A1

La biblioteca de ADN usada en la etapa (i) contiene un gran número de posibles secuencias con el fin de obtener un amplio margen de afinidades de unión. Preferiblemente, el número de secuencias iniciales es de 10^{14} , pero pueden usarse hasta 10^{18} . Todas las secuencias constan de una región central de secuencia aleatoria flanqueada por regiones de secuencia conocida de forma que los oligonucleótidos enriquecidos tras cada etapa de unión a la secuencia diana puedan ser amplificados usando cebadores específicos para tales regiones de secuencia conocida. Preferiblemente, la región central de secuencia aleatoria consta de 20 a 50 nucleótidos y las regiones laterales de secuencia constante constan de 20 a 40 nucleótidos. En una forma de realización preferida, la región central consta de 40 nucleótidos y cada región lateral consta de 28 nucleótidos cada una.

La invención contempla el uso como secuencia diana para la selección de oligonucleótidos que se unen específicamente tanto de una histona del género *Leishmania* como de un fragmento de la misma. En caso de que se use la histona completa, ésta puede haber sido producida de forma recombinante mediante cualquiera de las técnicas conocidas por el experto para la producción de proteínas recombinantes, incluyendo la expresión en bacterias (*E. coli*, *B. subtilis*), levaduras (*S. cerevisiae*, *P. pastoris*), células de insecto, células de plantas o células de mamífero.

En una forma de realización preferida de la invención, la secuencia diana que se usa en la etapa (i) del método de la invención es un péptido de una histona H2A que comprende una secuencia que corresponde a los amino ácidos 61 a 80 o a los amino ácidos 106 a 125 de la histona H2A de *L. infantum*. Por secuencia "que corresponde" a los amino ácidos 61 a 80 ó 106 a 125 de la histona H2A de *L. infantum* se entiende toda aquella secuencia que, en un alineamiento múltiple de secuencias entre todas las histonas del género *Leishmania*, se superpone con la región que consiste en los amino ácidos 61 a 80 ó 106 a 125 de la histona H2A de *L. infantum*. El alineamiento múltiple de secuencias se obtiene usando alguno de los métodos conocidos por el experto en la materia, preferiblemente mediante el uso del algoritmo ClustalW. En otra forma de realización preferida, la secuencia diana que se usa en la etapa (i) es un péptido que comprende los amino ácidos 61 a 80 ó los amino ácidos 106 a 125 de la histona H2A de *L. infantum*.

En la etapa (ii), las proteínas o péptidos diana se separan de los oligonucleótidos que no se han unido. La separación se lleva a cabo normalmente mediante cromatografía de afinidad con un ligando que es capaz de unirse específicamente a la proteína diana. En una forma preferida de la invención, la diana lleva una secuencia adicional que permite su aislamiento. Prácticamente cualquier péptido o secuencia peptídica que permita el aislamiento o purificación del péptido o proteína de fusión puede ser utilizada, por ejemplo, una secuencia de polihistidina, una secuencia peptídica reconocida por un anticuerpo monoclonal y que puede servir para purificar la proteína de fusión resultante por cromatografía de inmunoafinidad, por ejemplo, péptidos etiqueta tales como c-myc, HA, E, FLAG, etc. [Using Antibodies: A laboratory manual. Ed Harlow and David Lañe (1999). Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York. Capítulo: Tagging proteins. pp. 347-377] y, en general, cualquier otra secuencia reconocida por un anticuerpo.

En la etapa (iii), los oligonucleótidos que se han unido a la secuencia diana son amplificados mediante una reacción en cadena de polimerasa usando cebadores específicos para las secuencias laterales constantes.

Tras cada ronda de unión, selección y amplificación, va aumentando la afinidad de la población de oligonucleótidos a la vez que va disminuyendo la variabilidad de las secuencias de forma que, idealmente, tras varias rondas de selección, la mezcla final de ácidos nucleicos estará compuesta de un número reducido de secuencias distintas.

El número de rondas de selección dependerá del grado de afinidad deseado o hasta que no se observe mejora significativa de la afinidad tras repetir el ciclo de selección/amplificación. Preferiblemente, el número de rondas de unión/selección es de 2 a 20. En una forma de realización preferida, el número de rondas de selección es de 3.

La invención se describe a continuación mediante unos ejemplos que no son limitativos de la invención, sino ilustrativos.

Ejemplo 1

Material

ADN sintético aleatorio y cebadores no marcados se obtuvieron de Metabion (Martinsried, Alemania). Los cebadores marcados con digoxigenina se adquirieron a TIB BIOMOL (Berlín, Alemania), albúmina de suero bovino (bovine serum albumin, BSA) se obtuvo de Sigma. DMEM y PBS se adquirieron a GibcoBRL.

Ejemplo 2

Expresión y purificación de H2A recombinante

La histona H2A de *L. infantum* clonada en el vector de expresión pQE30 fue purificada mediante cromatografía de afinidad en columna de Ni-NTA según se ha descrito previamente (Iborra, S. *et al.* 2004, Vaccine, 22:3865-3876). En resumen, las células que expresaban H2A se recogieron y se resuspendieron en 2-5 volúmenes por gramo de peso húmedo de tampón de sonicación (urea 8M, NaH₂PO₄ 0.1M, Tris-HCl 0.01M pH 8.0). Tras la unión a la columna de

ES 2 356 439 A1

Ni-ácido nitroacético, las proteínas recombinantes se replegaron gradualmente en la columna según se ha descrito (Shi, P.Y. *et al.* 1997, *Biotechniques*, 23:1036-1038). Posteriormente, la proteína H2A recombinante se eluyó en imidazol al 0.3M y se dializó frente a PBS a 4°C y se liofilizó.

5 Ejemplo 3

Selección de aptámeros mediante SELEX

10 La selección de aptámeros de DNA de cadena sencilla (ssDNA) frente a la proteína H2A de *Leishmania* fue realizada a partir de una población de oligonucleótidos de ssDNA, designada como ronda 0 (Rd0), que contienen una región central aleatoria de 40 nucleótidos flanqueada por dos regiones conservadas de 28 nucleótidos de longitud cada una (5'-GCGGATGAAGACTGGTCT-40N-GTTGCTCGTATTTAGGGC-3'). La librería de ssDNA es desnaturada a 90°C hielo durante 10 min. Para la ronda inicial de selección SELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential enrichment), 2 nmol de ssDNA fueron mezclados con 2 pg de proteína recombinante H2A, que contiene una cola de 6 histidinas (6xHIS) en su extremo amino terminal, en 200 µl de solución de selección (20 mM Tris-HCl pH 7.4, 1 mM MgCl₂, 150 mM NaCl, 5 mM KCl, 0.2% BSA) e incubados a 37°C durante 30 min. Los complejos aptámero- H2A fueron purificados añadiendo 20 µL de resina de Ni-NTA (Qiagen) durante 1 h a 4°C. Después de lavar tres veces con 1 mL de solución de selección, los complejos de ssDNA-proteína fueron suspendidos de nuevo en 20 µL de agua destilada y amplificados por PCR utilizando los oligonucleótidos F3 (5'-GCGGATGAAGACTGGTGT-3') y R3 (5'-GTTGCTCGTATTTAGGGC-3') a una concentración de 1 pM, 250 pM dNTPs, en un volumen final de 200 µL a 56°C durante 25 ciclos. El producto de PCR fue precipitado con etanol. Después de 3 rondas de selección-amplificación, la población de aptámeros seleccionada (SELH2A) fue clonada en el vector pGEM y 20 de los clones fueron secuenciados y analizados.

25 Ejemplo 4

Ensayo de ELONA (Enzyme-linked oligonucleotide assay)

30 H2A recombinante de *L. infantum* se diluyó a 5 µg/ml (330 nM) en tampón de selección y 200 µL de solución (66 pmol por pocillo) se incubaron en una placa de 96 pocillos durante toda la noche a 4°C para permitir la unión a la placa y, a continuación, se lavaron 4 veces en tampón de selección. Posteriormente, se añadieron a cada pocillo 200 µL de la población de aptámeros SELH2A marcados con digoxigenina, del aptámero LiAPT1 (SEQ ID NO: 1) marcado con digoxigenina o de la población Rd0 también marcado con digoxigenina en tampón de selección a distintas concentraciones (0.2-100 nM) que habían sido desnaturados con anterioridad durante 10 min a 95°C. Se incubó la placa a 37°C durante 30 min y posteriormente, los pocillos individuales se lavaron 4 veces con tampón de selección para eliminar el ADN no unido. Posteriormente, se añadieron a cada pocillo 200 µL de una solución 1:1000 de anticuerpo anti-digoxigenina marcado con peroxidasa. Tras 30 minutos de incubación, las placas se lavaron 4 veces y se revelaron con una solución de ABTS (Boehringer-Mannheim) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Los valores de densidad óptica a 405 nm se determinaron usando un lector de microplacas de TECAN.

45 En otra serie de experimentos, la proteína H2A recombinante se diluyó a las concentraciones adecuadas (1.65-660 nM) en tampón de selección y 200 µL de cada solución se incubó en una placa de microtitulación de 96 pocillos a 4°C durante toda la noche. La población de aptámeros SELH2A marcada con digoxigenina o el aptámero LiAPT1 (SEQ ID NO: 1) también marcado con digoxigenina se diluyeron en tampón de selección hasta una concentración de 20 nM y se desnaturalizaron a 95°C durante 10 min y se enfriaron durante 10 min sobre hielo. Posteriormente, 200 µL de los aptámeros se añadieron a cada pocillo y la placa se incubó a 37°C durante 30 min. Los pocillos individuales se lavaron 3 veces, se añadió el anticuerpo anti-digoxigenina marcado con peroxidasa y se reveló usando una solución de ABTS (Boehringer-Mannheim). Experimentos similares se realizaron recubriendo los pocillos con 2 µg de las otras proteínas de *Leishmania* (H2B, H3, LIP0, LiP2a y LiP2b) para estudiar la especificidad de los aptámeros.

55 Ejemplo 5

Análisis slot blot con aptámeros

60 Se transfirieron varias cantidades bajo vacío de proteína H2A recombinante de *L. infantum* (1.65-33 pmol) y 7.5 pmol de BSA a una membrana de nitrocelulosa. Los filtros se lavaron 3 veces en PBS-T durante 10 min. Y se bloquearon con una disolución de leche en polvo al 5% en PBS-T durante 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente, las membranas se incubaron con los aptámeros LiAPT1 y LiAPT2 marcados con digoxigenina en una concentración de 100 nM en tampón de selección con agitación suave. Después del tiempo designado. Las membranas se lavaron con tampón de selección 3 veces y se incubaron con un anticuerpo anti-digoxigenina marcado con peroxidasa diluido 1 a 1000 durante 1 hora a temperatura ambiente. El exceso de enzima se eliminó mediante 3 lavados sucesivos con tampón de selección. Finalmente, las membranas se revelaron con un kit de quimioluminiscencia (Amersham) y se expusieron a una película. BSA se usó como control negativo.

Ejemplo 6

Estudios de cinéticas de unión

5 Con el fin de determinar la cinética de unión de los aptámeros a H2A, se llevaron a cabo experimentos de ELONA según se ha descrito anteriormente en los que la proteína H2A recombinante (66 pmol/well) se incubaron con el aptámero LiAPT1 o con la población de aptámeros SELH2A marcados en ambos casos con digoxigenina. Posteriormente, los pocillos individuales se lavaron 3 veces, se añadió el anticuerpo anti-digoxigenina marcado con peroxidasa y se reveló usando una solución de ABTS (Boehringer-Mannheim).

10

Ejemplo 7

Immunotransferencias

15

Se crecieron promastigotes de *L. infantum* en medio de Tagle modificado por Dulbecco (DMEM) que contenía suero fetal al 10% a 27°C. Para obtener extractos proteicos totales, los promastigotes se sedimentaron y se lisaron en tampón de lisis (Tris-HCl 125 mM a pH 6.8, SDS al 4%, EXDTA al 15 mM, glicerol al 20%, beta-mercaptoetanol al 10% y azul de bromofenol al 0.008%). Fracciones nucleares y citosólicas se separaron según Schreiber *et al.* (Nucleic Acids Res., 1989, 17:6419). De forma resumida, 2×10^7 promastigotes se sedimentaron, se lavaron dos veces en PBS frío, se resuspendieron en 400 microl de tampón A prerrefrigerado (Hepes 10 mM a pH 7.5, KCl al 10 mM, EDTA 0.1 mM, EGTA al 0.1 mM, DTT al 0.1 mM y PMSF al 0.5 mM) y se incubaron durante 15 minutos sobre hielo. Tras la incubación, se añadió NP40 (final al 0.6%) y se lisaron las células mediante agitación vigorosa durante 10 sec e, inmediatamente, se centrifugaron en una microfuga (13.000 g). El sobrenadante (fracción citosólica) se mezcló en una proporción 1:1 en tampón de Laemmli 2x. Los núcleos sedimentados se resuspendieron en tampón de Laemmli 1x. Posteriormente, las membranas se incubaron con los aptámeros LiAPT1 (SEQ ID NO: 1) y LiAPT2 (SEQ ID NO:2) a una concentración de 40 mM de tampón de selección y se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente con un anticuerpo anti-digoxigenina marcado con peroxidasa diluido 1 a 1000. Posteriormente, tras 3 lavados, se revelaron las membranas con un kit de quimioluminiscencia (ECL, Amersham Biosciences) y se expusieron a una película fotográfica.

30

Ejemplo 8

35 *Mapeo de la interacción H2A-SELH2A*

Nueve péptidos correspondientes a las secuencias solapadas de la proteína H2A de *L. infantum* (10 microg/pocillo) se incubaron en una placa de microanálisis de 96 pocillos durante toda la noche a 4°C y se lavaron 4 veces. Posteriormente, la población de aptámeros SELH2A marcados con digoxigenina a 0.5 microg/mL se desnaturalizaron durante 40 minutos a 95°C, enfriados durante 10 minutos sobre hielo y 100 microL de la solución se añadieron a cada pocillo. Posteriormente, la placa se incubó a 37°C durante 30 minutos, se lavó cuatro veces y se añadieron anticuerpos anti-digoxigenina marcados con peroxidasa a 37°C durante 30 min. y se reveló usando una solución de ABTS. La absorbencia a 405 nm se determinó usando un lector de microplacas de TECAN. Los péptidos se sintetizaron mediante el método sintético múltiple simultáneo en fase sólida usando una resina de poliamina y química FMOC. La pureza se comprobó mediante análisis de amino ácidos y HPLC.

45

Ejemplo 9

50 *Análisis estadístico*

Los resultados se presentan como la media \pm error estándar de la media (SEM) de 3 a 6 medidas independientes en experimentos separados y se analizaron usando GraphPad Prism v4 (San Diego, CA, USA). Los distintos análisis estadísticos se indican en el texto y los pies de figura.

55

Ejemplo 10

60 *Selección de aptámeros anti-H2A de una biblioteca combinatoria*

60

Aptámeros de ADN específicos para la proteína H2A de *L. infantum* se seleccionaron de una biblioteca de ADN de cadena sencilla formada por una región central de secuencia aleatoria flanqueada en los extremos 5' y 3' por secuencias constantes usadas para la amplificación mediante PCR. La biblioteca inicial contenía teóricamente 1014-1016 secuencias diferentes. Tras mezclarla con H2A, los oligómeros de la biblioteca pueden unirse a H2A. Durante este proceso, el candidato o los candidatos que se unen pueden hacerlo de forma específica a la diana y pueden ser recuperados con los cebadores F3 y R3. El número de ciclos de PCR se optimizó para evitar una amplificación excesiva. La rigurosidad de la selección se controló ajustando las concentraciones de antígeno. Las secuencias de ADN de cadena sencilla que mostraban afinidad por la diana se capturaron mando partículas de agarosa conjugadas

65

con níquel. La población de aptámeros seleccionada (Rd3) se clonó en el vector pGEM y 20 de los clones fueron secuenciados y analizados, obteniéndose las secuencias que se muestran en la figura 1.

5 Ejemplo 11

Especificidad y cinéticas de unión de los aptámeros anti-H2A

10 Las propiedades de unión de H2A de la población final obtenida la final tras tres rondas de selección-amplificación (Rd3) y la del aptámero purificado LiAPT1 fueron comparadas mediante el ensayo de ELONA. Como puede observarse en la Figura 2, tanto la población enriquecida Rd3 como el aptámero LiAPT1 es capaz de detectar la histona H2A recombinante, aunque el aptámero purificado proporciona una señal mayor para la misma cantidad de proteína recombinante, indicando que la sensibilidad de LiAPT1 para la detección de H2A es mayor que la de Rd3. La cinética de unión del aptámero LiAPT1 y la población Rd3 se estudió mediante la determinación de la unión de dichos aptá-
15 meros a la proteína recombinante. Los resultados se muestran en la figura 3, donde se observa que a tiempos cortos las cinéticas de unión de H2A a la población Rd3 y al aptámero LiAPT1 son indistinguibles pero que a tiempos más largos, el aptámero LiAPT2 proporciona una señal mayor que la población Rd3.

20 El reconocimiento de la proteína H2A de *L. infantum* por los clones seleccionados se realizó mediante experimentos de "slot-blot" en los que 50 ng y 500 ng de proteína H2A recombinante y 500 ng de BSA fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa y las proteínas inmovilizadas fueron detectadas con 100 nM de cada uno de los aptámeros marcados con digoxigenina. Como se observa en la Figura 4, ambos aptámeros reconocen con elevada afinidad la proteína H2A recombinante, pero no mostraron ninguna afinidad por el control negativo BSA.

25 Para estudiar la especificidad de los aptámeros seleccionados también se realizaron ensayos de Western blot en los que la proteína total y las fracciones citoplasmática y nuclear de promastigotes de *L. infantum* fueron inmovilizadas sobre membranas de PVDF y luego incubadas con los aptámeros seleccionados marcados con digoxigenina y reveladas con anticuerpo anti-digoxigenina-POD. Como se muestra en la Figura 5, los aptámeros seleccionados reconocen específicamente la proteína H2A endógena tanto en proteínas totales como en la fracción nuclear obtenidas a partir de
30 promastigotes de *L. infantum* pero, sin embargo, esta banda no aparece en la fracción citoplasmática. En los mismos experimentos se incluyó la proteína H2A recombinante como control positivo.

Ejemplo 12

35

Mapeo de los sitios de H2A implicados en la unión a los aptámeros LiAPT1 y LiAPT2

Para determinar los sitios de unión en H2A implicados en la interacción con los aptámeros de la invención, se llevaron a cabo ensayos ELONA con una colección de 9 péptidos que cubren completamente la estructura primaria de H2A (figura 6A). Según se muestra en la figura 6B, los aptámeros LiAPT1 y LiAPT2 reconocieron con gran
40 especificidad los péptidos 5 y 8 ($p < 0.01$; ANOVA seguido del test de Dunnett). Así mismo, el péptido 2 también fue reconocido aunque con una afinidad notablemente menor. A continuación decidimos localizar los péptidos en al estructura terciaria de H2A. La figura 6C muestra que los péptidos 5 y 8 se posicionan formando una región bolsillo correspondiente a un lateral de la proteína. Esta región es accesible cuando H2A se encuentra formando parte del
45 nucleosoma.

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Un aptámero que comprende un ácido nucleico de cadena sencilla que es capaz de unirse específicamente a una histona de un organismo perteneciente al género *Leishmania*.

2. Un aptámero según la reivindicación 1 en el que la histona a la que se une el aptámero es la histona H2A.

10 3. Un aptámero según las reivindicaciones 1 ó 2 en el que el organismo perteneciente al género *Leishmania* es *Leishmania infantum*.

4. Un aptámero según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en el que el ácido nucleico es ADN.

15 5. Un aptámero según la reivindicación 4, en el que aptámero comprende una secuencia definida por la siguiente fórmula:

5'-GCGGATGAAGACTGGTGT-X-GCCCTAAATACGAGCAAC-3'

20 en donde X es un oligonucleótido seleccionado del grupo de SEQ ID NO: 8 a 14 o una variante funcionalmente equivalente del mismo.

25 6. Un aptámero según la reivindicación 4, en el que el aptámero comprende una secuencia seleccionada del grupo de SEQ ID NO: 1 a 7 o una variante funcionalmente equivalente de la misma.

7. Uso de un aptámero según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o una mezcla de dichos aptámeros en un método *in vitro* para la detección de *Leishmania*.

30 8. Método de diagnóstico de una infección por *Leishmania* que comprende

(i) poner en contacto una muestra biológica de un paciente con al menos un aptámero tal que definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6

35 (ii) detectar la unión entre el aptámero y la muestra lo cual es indicativo de la presencia de *Leishmania* en la muestra.

40 9. Método según la reivindicación 8 en el que la infección por *Leishmania* es una leishmaniasis visceral, cutánea o mucocutánea.

10. Una composición farmacéutica que comprende al menos un aptámero según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 opcionalmente en combinación con uno o más soportes, excipientes o solventes farmacéuticamente aceptables.

45 11. Uso de al menos un aptámero según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para la preparación de un medicamento para el tratamiento de una infección por *Leishmania*.

50 12. Uso según la reivindicación 11 en el que la infección por *Leishmania* es una leishmaniasis visceral, cutánea o mucocutánea.

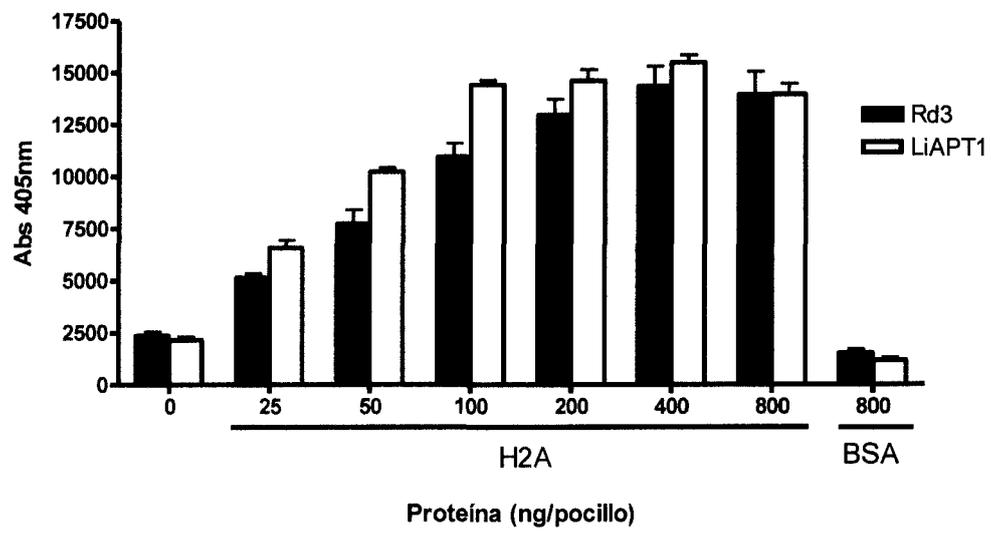


FIGURA 2

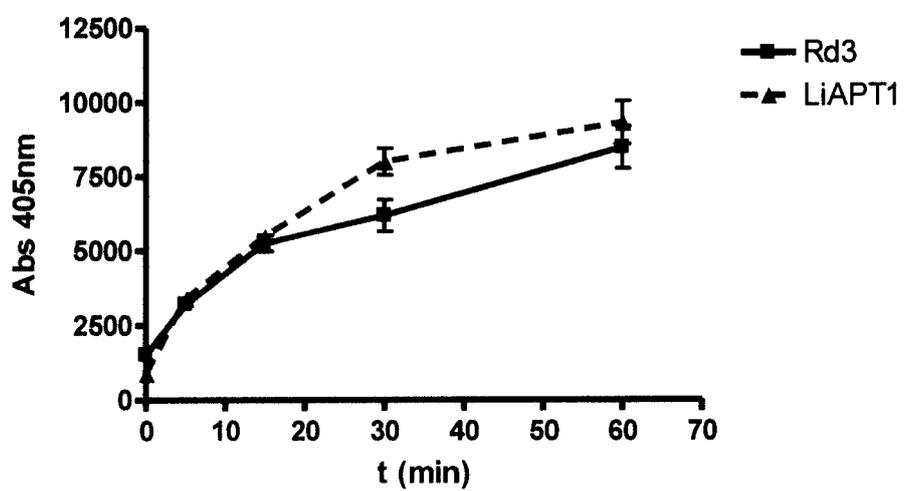


FIGURA 3

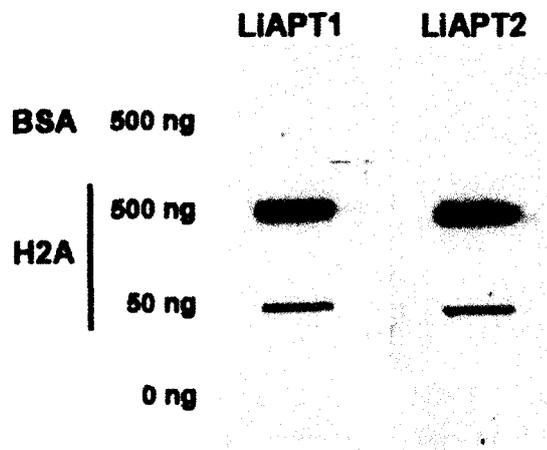


FIGURA 4

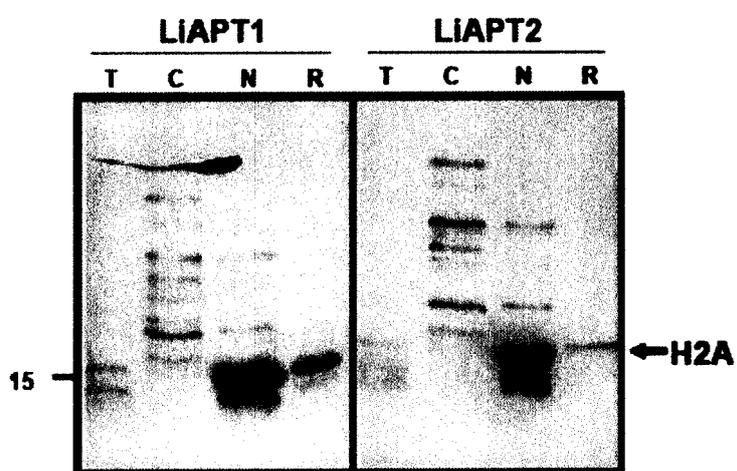


FIGURA 5

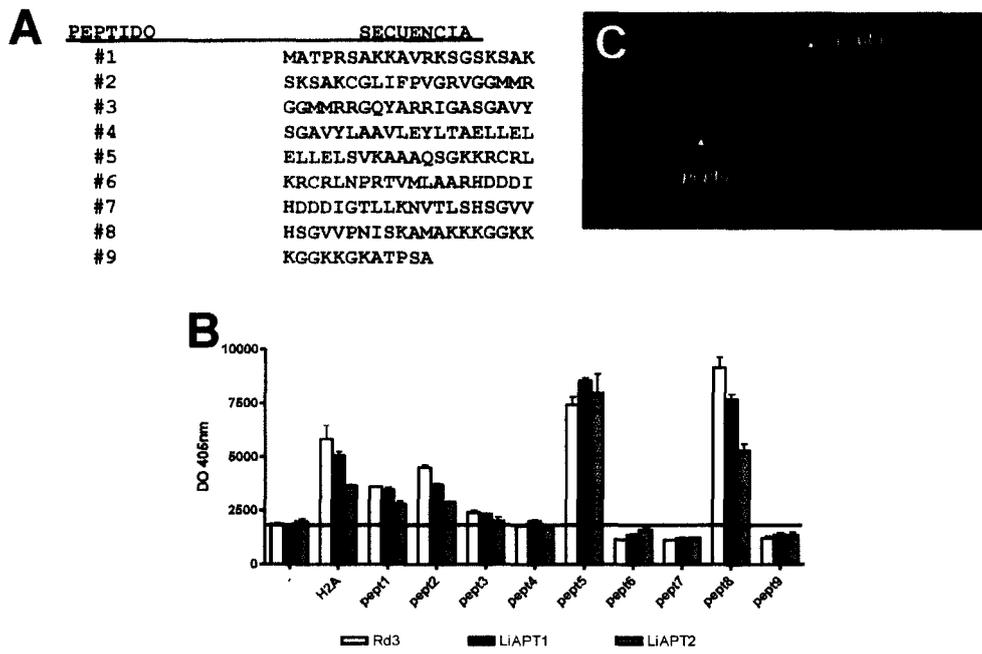


FIGURA 6

ES 2 356 439 A1

LISTA DE SECUENCIAS

<110> FUNDACIÓN PARA LA INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO RAMÓN Y CAJAL
5

<120> APTÁMEROS ESPECÍFICOS PARA HISTONAS DE LEISHMANIA

<130> P2866ES00
10

<160> 14

<170> PatentIn version 3.4
15

<210> 1
<211> 76
<212> DNA
20
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Aptámero específico para el antígeno H2A de *L. infantum* (LiAPT1)
25

<220>
<221> misc_feature
<222> (41)..(41)
30
<223> n is a, c, g, or t

<220>
<221> misc_feature
35
<222> (43)..(43)
<223> n is a, c, g, or t

40 <400> 1

gcggatgaag actggtgttg tgcaatgatt tttccggttg ntnaaagggg gaattgtagc 60

45 cctaaatagc agcaac 76

<210> 2
<211> 76
50
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
55
<223> Aptámero específico para el antígeno H2A de *L. infantum* (LiAPT2)

<400> 2

60 gcggatgaag actggtgtta gggttaacgt gtcagcgtag ctcaacagca caaagggggc 60

cctaaatagc agcaac 76

65

<210> 3
<211> 76

ES 2 356 439 A1

<212> DNA

<213> Artificial sequence

5 <220>

<223> Aptámero específico para el antígeno H2A de *L. infantum*

<220>

10 <221> misc_feature

<222> (27)..(27)

<223> n is a, c, g, or t

15 <220>

<221> misc_feature

<222> (32)..(32)

<223> n is a, c, g, or t

20

<400> 3

25

gcggatgaag actggtgtca agacganccc tntaagttca gcaatatgca gggttgtcgc 60

cctaaatacg agcaac 76

<210> 4

30

<211> 76

<212> DNA

<213> Artificial sequence

35

<220>

<223> Aptámero específico para el antígeno H2A de *L. infantum*

40 <220>

<221> misc_feature

<222> (42)..(42)

<223> n is a, c, g, or t

45

<400> 4

50

gcggatgaag actggtgtaa tgcggccggt gcttgacttg tntatagggt gtgtcggggc 60

cctaaatacg agcaac 76

<210> 5

55

<211> 76

<212> DNA

<213> Artificial sequence

60

<220>

<223> Aptámero específico para el antígeno H2A de *L. infantum*

65 <220>

<221> misc_feature

<222> (46)..(46)

ES 2 356 439 A1

<211> 40
<212> DNA
<213> Artificial sequence
5 <220>
<223> Región central del aptámero 1

10 <220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(9)
<223> n is a, c, g, or t
15 <220>
<221> misc_feature
<222> (14).. (14)
20 <223> n is a, c, g, or t

<400> 8
25 **caagacganc cctntaagtt cagcaatatg cagggttgtc** 40

<210> 9
30 <211> 40
<212> DNA
<213> Artificial sequence

35 <220>
<223> Región central del aptámero 2

<220>
40 <221> misc_feature
<222> (23)..(23)
<223> n is a, c, g, or t

45 <220>
<221> misc_feature
<222> (25)..(25)
50 <223> n is a, c, g, or t

<400> 9
55 **tgtgcaatga tttttccggt tgntnaaagg ggggaattgta** 40

<210> 10
60 <211> 40
<212> DNA
<213> Artificial sequence

65 <220>
<223> Región central del aptámero 3

ES 2 356 439 A1

<220>

<221> misc_feature

<222> (28)..(28)

5 <223> n is a, c, g, or t

<220>

<221> misc_feature

10 <222> (32)..(32)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 13

15

ggagtctacc ctgttttcta gtcttaangg gntatcccat

40

20 <210> 14

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial sequence

25

<220>

<223> Región central del aptámero 7

30 <400> 14

tagggttaac gtgtcagcgt agtcaacag caciaagggg

40

35

40

45

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 200802395

②② Fecha de presentación de la solicitud: 07.08.2008

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	RAMOS E. et al. "A DNA aptamer population specifically detects <i>Leishmania infantum</i> H2A antigen" Laboratory Investigation (2007) vol 87; páginas 409-416; DOI10.1038/labinvest.3700535; todo el documento.	1-4,7-12
A	SOTO M. et al. "Mapping of the linear antigenic determinants from the <i>Leishmania infantum</i> histone H2A recognized by sera from dogs with leishmaniasis" Immunology Letters (2 diciembre 1995) vol. 48; N° 3; paginas 209-214; DOI 10.1016/0165-2478(95)02473-5; todo el documento.	1-12
A	SOTO M. et al. "Molecular characterization of a <i>Leishmania donovai infantum</i> antigen identified as histone H2A" European Journal of Biochemistry (abril 1992) vol. 205; N° 1; páginas 211-216; DOI 10.1111/j.1432-1033.1992.tb16770.x; todo el documento.	1-12

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
21.03.2011

Examinador
M. García Coca

Página
1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C12N15/115 (2010.01)

A61K31/711 (2006.01)

G01N33/569 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12N, A61K, G01N

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 21.03.2011

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 5, 6	SI
	Reivindicaciones 1-4, 7-12	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 5, 6	SI
	Reivindicaciones 1-4, 7-12	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	RAMOS E. et al.	2007

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

El objeto de la invención tal y como se recoge en las reivindicaciones 1-12, es un aptámero (DNA de cadena sencilla) capaz de unirse específicamente a la histona H2A de *Leishmania infantum* (reiv. 1-6). También es objeto de la invención el uso de dicho aptámero para la detección de *Leishmania* (reiv. 7) y para la preparación de un medicamento para el tratamiento de leishmaniasis (reiv. 11 y 12), el método de diagnóstico de una infección por *Leishmania* (reiv. 8 y 9) y una composición farmacéutica que comprende dicho aptámero (reiv. 10).

Novedad y Actividad Inventiva

El documento D01 divulga aptámeros de DNA de cadena sencilla que específicamente se unen a la histona H2A de *Leishmania infantum*. Dichos aptámeros están formados por una secuencia variable de 40 nucleótidos flanqueada por dos secuencias conservadas de 18 nucleótidos cada una. En este documento se muestra la especificidad de estos aptámeros, reconociendo la histona H2A de *L. Infantum* haciendo que sean unos excelentes candidatos tanto para el diagnóstico como para la terapia de la infección por *L. Infantum*, ya que no reconoce histonas de otras especies (por ejemplo las humanas), ni otras proteínas de la misma especie.

El objeto de la invención recogido en las reivindicaciones 1-4 y 7-12 deriva directamente y sin ningún equívoco del documento D01. Por lo tanto, la invención según se recoge en dichas reivindicaciones carece de novedad y no implica actividad inventiva (art. 6.1 y art. 8.1 Ley 11/1986 de Patentes).