

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 537 201**

51 Int. Cl.:

C12N 15/11 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

A61P 33/06 (2006.01)

C07K 14/445 (2006.01)

C12R 1/90 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.02.2009 E 09708523 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.03.2015 EP 2247728**

54 Título: **Selección de aptámeros de ARN como agentes antipalúdicos**

30 Prioridad:

05.02.2008 SE 0800262

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

03.06.2015

73 Titular/es:

**APTAHEM AB (100.0%)
Skeppsbron 2
211 20 Malmö, SE**

72 Inventor/es:

**LINDH, JOHAN y
PERSSON, TINA**

ES 2 537 201 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

Selección de aptámeros de ARN como agentes antipalúdicos

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a aptámeros de ARN particulares contra una región conservada de la proteína 1 de membrana de eritrocitos de *Plasmodium falciparum* (PfEMP1) que van a usarse como agente antipalúdico. Además, la invención se refiere al uso de tales aptámeros para el diagnóstico de malaria de grave a menos grave.

10

Antecedentes de la invención

Los aptámeros son moléculas de ácido nucleico que tienen afinidad de unión específica a moléculas a través de interacciones distintas del apareamiento de bases de Watson-Crick clásico.

15

Los aptámeros, como los péptidos generados mediante presentación en fago o anticuerpos monoclonales ("AcM"), pueden unirse específicamente a dianas seleccionadas y modular las interacciones de unión o la actividad de la diana, por ejemplo, a través de la unión, los aptámeros pueden bloquear la capacidad de su diana para funcionar. Descubiertos mediante un procedimiento de selección *in vitro* de conjuntos de oligonucleótidos de secuencia aleatoria, se han generado aptámeros para más de 130 proteínas incluyendo factores de crecimiento, factores de transcripción, enzimas, inmunoglobulinas y receptores. Un aptámero típico tiene un tamaño de 10-15 kDa (20-45 nucleótidos), se une a su diana con una afinidad de nanomolar a subnanomolar, y discrimina entre dianas estrechamente relacionadas (por ejemplo, los aptámeros normalmente no se unirán a otras proteínas de la misma familia de genes). Una serie de estudios estructurales ha mostrado que los aptámeros pueden usar los mismos tipos de interacciones de unión (por ejemplo, enlaces de hidrógeno, complementariedades electrostáticas, contactos hidrófobos, exclusión estérica) que conducen a la afinidad y especificidad en los complejos de anticuerpo-antígeno.

20

25

Los aptámeros tienen varias características deseables para su uso como agentes terapéuticos y de diagnóstico incluyendo alta especificidad y afinidad, eficacia biológica y excelentes propiedades farmacocinéticas, además ofrecen ventajas competitivas específicas con respecto a la biología de los anticuerpos y otras proteínas, por ejemplo:

30

1) Velocidad y control. Los aptámeros se producen mediante un procedimiento completamente *in vitro*, permitiendo la rápida generación de agentes de partida iniciales, incluyendo agentes de partida terapéuticos. La selección *in vitro* permite que la especificidad y la afinidad del aptámero se controlen estrechamente y permite la generación de agentes de partida, incluyendo agentes de partida contra dianas tanto tóxicas como no inmunogénicas.

35

2) Toxicidad e inmunogenicidad. Los aptámeros como clase han demostrado una toxicidad y falta de inmunogenicidad terapéuticamente aceptables. Mientras que la eficacia de muchos anticuerpos monoclonales puede verse gravemente limitada por la respuesta inmunitaria frente a los propios anticuerpos, es extremadamente difícil obtener anticuerpos frente a aptámeros, lo más probablemente porque los aptámeros no pueden presentarse por células T a través del CMH y la respuesta inmunitaria generalmente está entrenada para no reconocer fragmentos de ácido nucleico.

40

3) Administración. Mientras que la mayoría de los agentes terapéuticos de anticuerpo aprobados actualmente se administran mediante infusión intravenosa (normalmente a lo largo de 2-4 horas), los aptámeros pueden administrarse mediante inyección subcutánea (la biodisponibilidad de los aptámeros a través de la administración subcutánea es >80% en estudios con monos (Tucker *et al.*, J. Chromatography B. 732: 203-212, 1999)). Con buena solubilidad (>150 mg/ml) y peso molecular comparativamente bajo (aptámero: 10-50 kDa; anticuerpo: 150 kDa), puede administrarse una dosis semanal de aptámeros mediante inyección en un volumen de menos de 0,5 ml. Además, el pequeño tamaño de los aptámeros les permite penetrar en zonas de limitaciones conformacionales que no permiten que penetren anticuerpos ni fragmentos de anticuerpos, presentando aún otra ventaja de profilaxis o acción terapéutica basada en aptámeros.

50

4) Aumento de producción y coste. Los aptámeros terapéuticos se sintetizan químicamente y, en consecuencia, puede aumentarse su producción según sea necesario para cumplir con las demandas de producción. Mientras que las dificultades en el aumento de producción están limitando actualmente la disponibilidad de algunos agentes biológicos y el coste de capital de una planta de producción de proteínas a gran escala es enorme, un único sintetizador de oligonucleótidos a gran escala puede producir más de 100 kg/año y requiere una inversión inicial relativamente modesta. El coste actual de productos para la síntesis de aptámeros a escala de kilogramos se estima en 500 \$/g, comparable al de anticuerpos altamente optimizados. Se espera que las mejoras continuas en el desarrollo de procedimientos disminuya el coste de los productos hasta < 100 \$/g en cinco años.

55

60

5) Estabilidad. Los aptámeros terapéuticos son robustos químicamente. Están intrínsecamente adaptados para recuperar su actividad tras la exposición a factores tales como calor y agentes desnaturalizantes y pueden almacenarse durante periodos prolongados (>1 año) a temperatura ambiente como polvos liofilizados.

65

Además, el procedimiento de descubrimiento de aptámeros permite fácilmente la modificación de agentes de partida, tal como la optimización de la secuencia del aptámero y la minimización de la longitud del aptámero [Conrad *et al.* 1996, Eaton *et al.* 1997]. Adicionalmente, pueden utilizarse modificaciones en 2' tales como 2'-fluoro y 2'-O-Me para la estabilización contra nucleasas sin comprometer la interacción de unión del aptámero con la diana. Véanse por ejemplo Lin *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 22, 5229-5234 (1994); Jellinek *et al.*, *Biochemistry* 1995, 34, 11363-1137; Lin *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 1994, 22, 5229-5234; Kubik *et al.*, *J Immunol.*, 1997, 159(1), 259-267; y Pagratis *et al.*, *Nat. Biotechnol.*, 1997, 1, 68-73.

La malaria grave se produce casi exclusivamente por infección por *P. falciparum* y habitualmente surge 6-14 días tras la infección. Las consecuencias de la malaria grave incluyen coma y muerte si no se trata (los niños pequeños y las mujeres embarazadas son especialmente vulnerables). Pueden producirse esplenomegalia (aumento del tamaño del bazo), cefalea grave, isquemia cerebral, hepatomegalia (aumento del tamaño del hígado), hipoglucemia y hemoglobinuria con insuficiencia renal. La insuficiencia renal puede producir fiebre de las aguas negras, en la que la hemoglobina procedente de los glóbulos rojos lisados se filtra a la orina. La malaria grave puede avanzar de manera extremadamente rápida y producir la muerte en el plazo de horas o días. En los casos más graves de la enfermedad, las tasas de mortalidad pueden superar el 20%, incluso con atención y tratamiento intensivos. En zonas endémicas, el tratamiento a menudo es menos satisfactorio y la tasa de mortalidad global para todos los casos de malaria puede ser de hasta uno de diez. A un plazo más largo, se han documentado alteraciones del desarrollo en niños que han padecido episodios de malaria grave.

Plasmodium falciparum es el agente causante de la malaria grave en seres humanos. Millones de personas en todo el mundo resultan infectadas cada año por *P. falciparum* y más de un millón mueren, la mayoría de ellas niños pequeños en el África subsahariana. La elección de fármacos para el tratamiento de la malaria ha sido en el pasado principalmente quinina y cloroquina y desde los años 1960, sulfadoxina/pirimetamina (SP). Desgraciadamente, se ha documentado resistencia de los parásitos a todos estos fármacos en regiones endémicas. El fármaco más eficaz usado en la actualidad como tratamiento de primera línea es la artemisinina y sus derivados. Aunque no se ha demostrado resistencia clínica a la artemisinina, hay indicaciones de una resistencia *in vitro* desarrollada al fármaco en *P. falciparum*. Se ha descrito inmunidad no estéril contra la malaria grave en residentes en regiones endémicas. Esto indica la existencia de homogeneidad antigénica en los parásitos que producen la malaria grave.

La proteína que se sabe que es responsable de la malaria cerebral grave mediante el proceso de formación de rosetas y adherencia endotelial es la proteína 1 de membrana de eritrocitos (PfEMP1) expresada en la superficie del eritrocito infectado. Expuesta en el eritrocito infectado, se une a varios receptores de superficie de células humanas tales como sulfato de heparina, ICAM-1, CD36, CSA, permitiendo que el parásito se adhiera al revestimiento endotelial de los vasos sanguíneos pequeños (citoadherencia) así como a eritrocitos no infectados (formación de rosetas), evitándose así el aclaramiento esplénico del torrente circulatorio. Tales parásitos secuestrados producen una obstrucción considerable a la perfusión tisular.

PfEMP1 consiste principalmente en dominios de tipo unión a Duffy (DBL) y regiones de entre dominios ricas en cisteína (CIDR), y el número de dominios y el tamaño de la proteína varían dependiendo de cuál de los 60 genes *var* se exprese. El hecho de que el parásito cambie regularmente el gen *var* expresado y que genere por tanto variación antigénica de la superficie del eritrocito infectado facilita que el parásito evite el sistema inmunitario del huésped. Aunque se espera determinada conservación de secuencia debido a la función adhesiva de esta proteína. El fenotipo asociado con virulencia, la formación de rosetas, está mediado por el dominio de tipo unión a Duffy N-terminal (DBL1 α) que tiene un alto grado de conservación de secuencia entre los dominios de PfEMP1. Se desconoce la estructura definitiva de DBL1 α , aunque se ha realizado un amplio modelado en dominios con estructura similar. Esto hace de DBL1 un candidato atractivo para el desarrollo de fármacos novedosos contra la malaria grave. Se han realizado intentos de reconocimiento por anticuerpos de los epítopos estructurales conservados en DBL1 α sin gran éxito debido al hecho de que las regiones conservadas están algo enmascaradas por las regiones variables, lo que que las hace inaccesibles al anticuerpo comparativamente grande.

Chen, Q. *et al.*, *Vaccine* 22, (2004) págs. 2701-2712 dan a conocer que la inmunización con PfEMP1-DBL1 α genera anticuerpos que alteran las rosetas y protegen contra el secuestro de eritrocitos infectados por *Plasmodium falciparum*. El uso de la proteína PfEMP1-DBL1 α para producir anticuerpos es un tratamiento terapéutico secundario, mientras que el mercado pide un agente y método terapéuticos directos.

Moll, K. *et al.*, *Inf. Imm.* vol. 75(1), (enero de 2007), págs. 211-219 dan a conocer la generación de anticuerpos de protección cruzada contra el secuestro de *Plasmodium falciparum* mediante inmunización con un dominio 1 α de tipo de unión a Duffy de la proteína 1 de membrana de eritrocitos. Este trabajo también aborda que el uso de la proteína PfEMP1-DBL1 α para producir anticuerpos es un tratamiento terapéutico secundario, mientras que el mercado pide un agente y método terapéuticos directos.

Basándose en estas características, los presentes inventores diseñaron un protocolo de evolución sistemática de ligandos por enriquecimiento exponencial (*Systematic Evolution of Ligand by Exponential Enrichment*, SELEX), que

pudo diseñarse para permitir la selección de aptámeros de ARN para unirse con alta afinidad y especificidad a las partes estructuralmente conservadas de DBL1 α .

5 Ulrich, H. *et al.*, J. Biol. Chem, vol. 277 (2002), págs. 20756-20762 describen el método de SELEX para la selección *in vitro* de aptámeros de ARN que se unen a receptores de adhesión celular de *Trypanosoma cruzi* e inhiben la invasión celular.

10 Se ha notificado una estrategia similar para otros parásitos patógenos en la que se han seleccionado satisfactoriamente aptámeros contra proteínas de superficie virulentas. En un caso notificado, se seleccionaron aptámeros de ARN de alta afinidad contra la glicoproteína variable de superficie (VSG) de *Trypanosoma brucei* que demostraron poder dirigir anticuerpos a la superficie de tripanosomas vivos. El otro estudio notificado usó un enfoque diferente. La selección no se realizó usando proteínas de superficie expresadas de *Trypanosoma cruzi*, sino usando una técnica de desplazamiento con 4 receptores de superficie humanos diferentes (Ulrich, H. *et al.*, citado anteriormente).

15 *Trypanosoma cruzi* produce problemas cardiacos en estadio crónico, por lo que el tratamiento implica tratar las manifestaciones clínicas de la enfermedad. Por ejemplo, los marcapasos y medicamentos para ritmos cardiacos irregulares pueden salvar vidas para muchos pacientes con enfermedad cardiaca crónica, mientras que puede requerirse cirugía para megaintestino. Sin embargo, la enfermedad no puede curarse en esta fase. La enfermedad cardiaca crónica producida por la enfermedad de Chagas es ahora un motivo común para la cirugía de trasplante de corazón. Sin embargo, hasta hace poco la enfermedad de Chagas se consideraba una contraindicación para el procedimiento, puesto que el daño cardiaco podría reaparecer ya que se esperaba que el parásito aprovechara la oportunidad proporcionada por la inmunosupresión que sigue a la cirugía.

25 Se ha demostrado que los aptámeros presentan la misma alta especificidad y afinidad por sus dianas que los anticuerpos. Además de una unión eficaz, los aptámeros también presentan una actividad inhibitoria de sus dianas. El método de SELEX se basa en un procedimiento iterativo de repetir etapas de ciclos de selección *in vitro* en el que se reduce la biblioteca de ADN/ARN inicial de 10^{14} - 10^{15} moléculas diferentes hasta un conjunto más pequeño de aproximadamente 100 moléculas diferentes que tienen alta afinidad por la diana en cuestión.

30 Lee, J. F., *et al.*, Curr Opi. Chem. Biol. (2006), 10:282-289 es una revisión sobre el avance en agentes terapéuticos de aptámeros. De ese modo, se habla de aptámeros anti-VIH-1, anti-VEGF, anti-RET, anti-teofilina y anti-tenascina-C.

35 Hjalmarsson, K. *et al.*, FOI-R-1216-SE (ISSN 1650-1942) comentan aptámeros – herramientas futuras para diagnóstico y terapia, y se refieren en particular a la metodología de SELEX. Se facilita una visión general de diferentes aptámeros y su uso opcional.

40 Göringer, H. U., *et al.*, Int. J. Parasit. 33 (2003), 1309-1317 dan a conocer la selección *in vitro* de ligandos de ácidos nucleicos de alta afinidad para moléculas diana de parásitos, y comentan la malaria, por lo que los autores concluyeron principalmente que el proceso de desarrollo ha sido lento porque los métodos de selección aleatorios de componentes no han sido satisfactorios a la hora de identificar compuestos antiparasitarios. Los autores se concentran en comentar el protocolo de SELEX. Aunque la malaria es el primer parásito que se menciona, no hay ninguna indicación de que sus efectos adversos puedan tratarse usando un aptámero, sino que los autores comentan que *Trypanosoma brucei* la enfermedad del sueño.

45 Normark, J. *et al.*, PNAS, (2007) vol. 104, págs. 15835-15840 dan a conocer que los motivos de aminoácidos de PfEMP1-DBL1 α están presentes en varios estados patológicos graves de la malaria por *Plasmodium falciparum*. El documento no comenta los aptámeros como posibles agentes en el tratamiento de la malaria grave producida por *Plasmodium falciparum* sino que comenta la obtención de anticuerpos como posible régimen.

50 Krause, D. R. *et al.*, Inf. Imm. vol 75, (2007) págs. 5967-5973 dan a conocer la respuesta de anticuerpos contra *Plasmodium falciparum* y comentan que el suero de un voluntario inhibe la formación de rosetas. Los autores afirman que “la diversidad de esta proteína (PfEMP1) dentro de y entre parásitos combinada con el cambio antigénico entre variantes dificulta el estudio del desarrollo de la inmunidad específica frente a PfEMP1”.

55 El documento WO 2004/080420 concedido a Mota *et al.* da a conocer en términos generales métodos para prevenir o inhibir la actividad de la malaria *in vivo* mediante la administración de un agente antipalúdico a un mamífero que lo necesita e indica varias rutas diferentes para interferir en la misma. En particular, la divulgación comenta la inhibición de MET, siendo MET el receptor para el factor de crecimiento de hepatocitos. La divulgación menciona incluso aptámeros sin ninguna especificación. En general, la divulgación es muy conceptual sin ofrecer ninguna solución específica, sino sólo ideas sobre posibles vías para tratar la malaria.

65 Jayasena, S. D. Clin. Chem. 45:9 (1999) págs. 1628-1650 da a conocer aptámeros como una clase emergente de moléculas que rivalizan con los anticuerpos en el diagnóstico. Sin embargo, la divulgación no da ninguna indicación de aptámeros terapéuticos para tratar la malaria.

Los presentes inventores muestran además que estos aptámeros que se unen con alta afinidad específica pueden unirse a PfEMP1 sobre la superficie del parásito vivo y finalmente, que tienen la capacidad de alterar rosetas. En el presente documento se demostrará la unión específica de un conjunto de aptámeros que tienen un efecto *in vitro* en la formación de rosetas. Además se propone usar estos aptámeros para diagnosticar la presencia o no de malaria grave, es decir, para discriminar entre las formas leve (o más bien formas menos graves) y graves de la malaria.

Sumario de la presente invención

Por tanto la presente invención se refiere a determinados aptámeros de ARN o fragmentos activos de los mismos obtenidos contra PfEMP1 como agente antipalúdico.

Descripción detallada de la presente invención

En particular, la presente invención se refiere a determinados aptámeros de ARN obtenidos contra la región semiconservada del dominio 1 α de tipo unión a Duffy, DBL1 α , de la proteína 1 de membrana de eritrocitos de *Plasmodium falciparum*, PfEMP1.

En una realización preferida de la misma, la invención se refiere a un aptámero seleccionado del grupo que consiste en

UAGCUCACCACACCAGCAAUCAACGCGUUUUUCAAACACUGGCACAUGA (SEQ. ID. NO. 4)

AACAAUACGACUACACCAUCAAAAGUAUUAUCUUGCAUCGAAGGUUGGCA (SEQ. ID. NO. 5),

y

GUGACCACGCGGAUAAAUGAAUCAAAAACAACAACCAGGGCCGUUCGACUACGC
UAAUUAUCCCG (SEQ. ID. NO. 6)

o un fragmento activo del mismo.

En una realización adicional preferida de la misma, la invención se refiere a un aptámero seleccionado del grupo que consiste en aptámeros fluorados que consisten en

U^FAGC^FU^FC^FAC^FC^FAC^FAC^FC^FAGC^FAAU^FC^FAA^FGC^FGU^FU^FU^FU^FU^FC^FAAAC^FAC^FU^F
GGC^FAC^FAU^FGA (SEQ. ID. NO. 10)

AA^FAAU^FAC^FGAC^FU^FAC^FAC^FC^FAU^FC^FAAAAGU^FAU^FU^FAU^FC^FU^FU^FGC^FAU^FC^FGAAG
GU^FU^FGGC^FA (SEQ. ID. NO. 11)

GU^FGAC^FC^FAC^FGC^FGGAU^FAAU^FGAAU^FC^FAAAAC^FAA^FAC^FC^FAGGGC^FC^FGU^F
U^FC^FGAC^FU^FAC^FGC^FU^FAAU^FU^FAU^FC^FC^FC^FG (SEQ. ID. NO. 12)

o un fragmento activo del mismo.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso de uno o más aptámeros, o un fragmento activo del mismo/de los mismos, obtenido(s) contra la región semiconservada del dominio 1 α de tipo unión a Duffy, DBL1 α , de la proteína 1 de membrana de eritrocitos de *Plasmodium falciparum* (PfEMP1) en el tratamiento de la malaria cerebral.

En una realización preferida de la misma, la invención se refiere a que el aptámero se selecciona del grupo que consiste en

TAGCTCACCACACCAGCAATCAACGCGTTTTTTCAAACACTGGCACATGA (SEQ. ID. NO. 4)

AACAATACGACTACACCATCAAAGTATTATCTTGCATCGAAGGTTGGCA (SEQ. ID. NO. 5),

y

GTGACCACGCGGATAAATGAATCAAAAACAACAACCAGGGCCGTTCTGACTACGC
TAATTATCCCG (SEQ. ID. NO. 6).

- 5 En una realización adicional preferida de la misma, la invención se refiere a que el aptámero se selecciona del grupo que consiste en aptámeros fluorados que consisten en

U^FAGC^FU^FC^FAC^FC^FAC^FAC^FC^FAGC^FAAU^FC^FAA^FGC^FGU^FU^FU^FU^FU^FC^FAAAC^FAC^FU^F
GGC^FAC^FAU^FGA (SEQ. ID. NO. 10)

10 AAC^FAAU^FAC^FGAC^FU^FAC^FAC^FC^FAU^FC^FAAAAGU^FAU^FU^FAU^FC^FU^FU^FGC^FAU^FC^FGAAG
GU^FU^FGGC^FA (SEQ. ID. NO. 11)

GU^FGAC^FC^FAC^FGC^FGGAU^FAAU^FGAAU^FC^FAAAAC^FAA^FAC^FC^FAGGGC^FC^FGU^F
U^FC^FGAC^FU^FAC^FGC^FU^FAAU^FU^FAU^FC^FC^FC^FG (SEQ. ID. NO. 12).

- 15 Todavía un aspecto adicional de la invención se refiere a una herramienta de diagnóstico para determinar la presencia de malaria grave, determinando la respuesta de una muestra de sangre a un aptámero obtenido contra la región semiconservada del dominio 1 α de tipo unión a Duffy, DBL1 α , de la proteína 1 de membrana de eritrocitos de *Plasmodium falciparum*, PfEMP1.

- 20 La invención se describirá a continuación con referencia a los experimentos llevados a cabo. Estos experimentos se refieren al aislamiento de determinados aptámeros de ARN, así como al efecto biológico de tales aptámeros de ARN determinados en el caso de formación de rosetas.

Expresión de DBL1 α en *E. coli*.

- 25 Expresión de proteínas en *E. coli*. Se expresó DBL1^{his} recombinante a partir de FCR3S1.2 tal como sigue. Se hicieron crecer células SG13009 (pREP4) de Qiagen que albergaban plásmidos pQE-TriSystem His *Strep* 2 (DBL1^{his}) o pQE-60 (DBL1^{his}) [22] en medio LB que contenía ampicilina (100 μ g/ml) y kanamicina (30 μ g/ml) o bien a 22°C o bien a 37°C. A DO₆₀₀ = 0,8 se indujeron las células con IPTG 0,1 mM durante 3 h; se recogió 1 litro de suspensión celular (4°C, 25 min, 3000 g) y se resuspendió en 25 ml de tampón de lisis (NaH₂PO₄ 50 mM/NaOH pH 7,4, NaCl 300 mM, PMSF 1 mM (Sigma), Triton X-100 al 0,05%, imidazol 10 mM). Se incubaron las células con Lysozyme en hielo durante 30 min y se sonicaron. Se retiró el desecho de células insolubles mediante centrifugación (4°C, 30 min, 18.000 g). Se trató el sobrenadante con ADNasa y se incubó con 1 ml de perlas de Ni-NTA agarosa (Qiagen) durante 2 h a 4°C con agitación suave. Se sedimentaron las perlas a 100 x g durante 3 min y se lavaron 3 veces con 15 ml de tampón de lavado (NaH₂PO₄ 50 mM/NaOH pH 7,4, NaCl 300 mM, Triton X-100 al 0,05%, imidazol 30 mM). Se eluyó la proteína unida con imidazol 400 mM (Sigma), NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 300 mM que se retiró posteriormente mediante diálisis frente a tampón de PBS con Triton X-100 al 0,05% durante 18 h a 4°C. Se estimó la pureza de la proteína haciendo pasar las muestras sobre SDS-PAGE al 10% y finalmente se determinó la concentración de proteína (Bradford 1976). Alternativamente, se purificó DBL1 con cola de His en FPLC. Se cargó la fracción soluble extraída de *E. coli* en una columna de Ni en FPLC (Amersham Biosciences) con una velocidad de flujo de 0,5 ml/min. Se lavó la proteína unida con gradiente de imidazol 5-70 mM (60 ml a 1 ml/min). Se eluyó la proteína con imidazol 400 mM y se analizó tal como se describió anteriormente. Todos los productos químicos se obtuvieron de Sigma.

- 45 Se optimizó la secuencia completa de DBL1 α a partir de FCR3S1.2 (Moll K, Pettersson F, Vogt AM, Jonsson C, Rasti N, *et al.* (2007) Generation of cross-protective antibodies against *Plasmodium falciparum* sequestration by immunization with an erythrocyte membrane protein 1-duffy binding-like 1 alpha domain. *Infect Immun* 75: 211-219) con respecto al uso de codones para la expresión en *E. coli*. Mediante la purificación de alta afinidad con cola de His se purificó DBL1 α soluble (figura 1). Se confirmó la verificación de DBL1 α ^{his} con inmunotransferencia de tipo Western usando anticuerpos específicos frente a DBL1 α o cola de His. Se ha analizado el dominio recombinante para determinar la "actividad" mediante su afinidad por heparina, una de las principales dianas para DBL1 α . El dominio recombinante se une a heparina tanto en forma libre como en columnas de heparina.

Selección de aptámeros de ARN específicos de DBL1 α .

- 55 Para la selección *in vitro* se usó una biblioteca combinatoria de 5 x 10¹⁴ secuencias de ARN elegidas aleatoriamente.

La biblioteca consistía en secuencias que tenían un tamaño de 50 nucleótidos flanqueadas por sitios de unión a cebador de 20 nucleótidos que daban como resultado moléculas de ARN de 90 nucleótidos. Se llevó a cabo la transcripción de ARN de T7 en presencia de nucleótidos de pirimidina modificados con 2'F para seleccionar aptámeros estables en suero. La estrategia fue enriquecer en aptámeros que tuviesen afinidad por el dominio DBL1 α recombinante de la cepa FCR3S1.2 de alta formación de rosetas. Se realizaron ocho rondas de selección y amplificación en DBL1 α unido previamente a perlas de níquel. Se monitorizó el transcurso del experimento mediante la determinación del porcentaje de ARN unido en cada ronda de SELEX (figura 2). Se observó una recuperación creciente de ARN a través de las rondas de selección y se logró una unión máxima en la ronda 8 con una recuperación de ARN de aproximadamente el 58%. Para evitar la unión no específica a la matriz de Ni-NTA agarosa (Qiagen), se realizó una preselección en una matriz pura antes de cada ronda de selección. Se clonó el conjunto de ADN amplificado de la ronda 8 en un vector de TA y se determinaron las secuencias de nucleótidos de 70 clones individuales. Los datos bioinformáticos usando MEME/MAST muestran una agrupación de clones en varios grupos conservados.

Agrupamiento de clones secuenciados usando MEME/MAST.

La búsqueda de motivos dio como resultado una clasificación de los clones en varios grupos conservados diferentes. El grupo más conservado (A) contenía 6 miembros. Los grupos (B) a (D) tenían valores estadísticamente significativos, mientras que los dos últimos grandes grupos tenían un bajo grado de conservación. Se identificaron en la base de datos muchos grupos más pequeños pero bien conservados con 3-4 miembros enumerados. La columna de la derecha en la tabla 1 es la frecuencia con la que aparece la secuencia consenso dentro de los 70 clones sometidos a prueba. Pocos clones, tales como g06 y g07, se dividieron en dos grupos (A y D). Se detecta una observación interesante cuando se predice la estructura secundaria usando mfold (software informático gratuito) en la región aleatorizada de clones en el grupo rico en G-T (E). Estos clones construyen estructuras bastante estables con bajos valores de ΔG y puntos de fusión por encima de 55°C. Los clones del grupo (F), a diferencia de los clones del grupo (E), no tienen estructuras secundarias estables cuando se realizaron predicciones mediante mfold para la región aleatorizada. Finalmente, estaba presente un gran número de huérfanos entre los 70 clones.

Tabla 1. Secuencias consenso de múltiples niveles aisladas generadas por el software MEM/MAST en los 70 clones secuenciados a partir de la selección *in vitro* en DBL1 α ^{His}.

(Grupo) y secuencia consenso de múltiples niveles	Puntuación de probabilidad en MEME	Incidencia
(A): G A C T G A T T A C G C C A G C T T G G	(E= 7,9 x 10 ⁻²⁰)	8,6%
(B): C A C A C T G G C G G C C G C T C G A G	(E= 2,0 x 10 ⁻⁷)	5,7%
(C): A A T T C G C C C T T G C C G	(E= 3,9 x 10 ⁻⁶)	12,9%
(D): A G C T C G G A T C C A C T A A T A A	(E= 1,6 x 10 ⁻⁴)	12,9%
(E): G T T G T T G G T T T G G C T T G T T	(E= 6,2 x 10 ⁰)	25,7%
(F): A A C A C C A A C A C C A A C A	(E= 3,0 x 10 ³)	18,6%

Pruebas de aptámeros individuales en DBL1 α ^{His} recombinante. Se sometió a prueba un número sustancial de clones para determinar la unión en DBL1 α ^{His}. Se analizaron clones marcados radiactivamente para determinar la recuperación en DBL1 α ^{His} con ARN no seleccionado del conjunto 0 como control negativo. De esta manera, pudo observarse la variación en la afinidad de unión entre diferentes clones. Los clones que presentaron un grado superior de unión se usaron para estudios adicionales. La concentración de proteína era de 350 - 400 nM y de ARN era de 40 nM en el experimento presentado en la figura 3. Los clones b02, d12, e05 tuvieron un nivel de recuperación similar (70%) mientras que el ARN no seleccionado del conjunto 0 tuvo una tasa de recuperación del 11,7%. El conjunto 8, que representa el conjunto seleccionado por SELEX final tuvo una tasa de recuperación del 51%. El clon e11 tuvo un nivel de recuperación menor que b02, d12, e05, lo que indica una afinidad de unión inferior. Se realizaron otros diversos experimentos de unión (datos no mostrados) y el nivel de recuperación de ARN en los clones seleccionados fue en general inferior al 70%, pero siempre significativamente mayor (en un factor de 2-5) que el ARN no seleccionado. Una conclusión de los experimentos realizados fue que la razón entre DBL1 α ^{His} y ARN tuvo el efecto más profundo sobre el nivel de recuperación. ARN/DBL1 α ^{His} a 1:9 dio como resultado generalmente altas tasas de recuperación, mientras que ARN/DBL1 α ^{His} a una razón de 1:3 dio como resultado bajos niveles de recuperación (clones seleccionados con recuperaciones del 12-25% y ARN no seleccionado con el 1-4%). Los clones que mostraron tasas de recuperaciones superiores se eligieron para los ensayos de cambio de movilidad electroforética y se sometieron a prueba en un ensayo con células vivas.

Se determinaron las secuencias de ácido nucleico de los clones d12, b02 y e05, respectivamente y se representan mediante las siguientes secuencias de ARN:

d12
UAGCUCACCACACCAGCAAUCAACGCGUUUUUUCAAACACUGGCACAUGA (SEQ. ID. NO. 4),

b02

AACAAUACGACUACACCAUCAAAAAGUAUUAUCUUGCAUCGAAGGUUGGCA (SEQ. ID. NO. 5),

e05

GUGACCACGCGGAUAAAUGAAUCAAAAACAACAACCAGGGCCGUUCGACUACGC

UAAUUAUCCCG (SEQ. ID. NO. 6)

5 Para mejorar el tiempo de semivida y la estabilidad del aptámero en sangre, puede fluorarse en uno o más átomos de carbono, preferiblemente en todos los átomos de carbono. De los aptámeros dados a conocer anteriormente, se obtendrán entonces los siguientes aptámeros:

U^FAGC^FU^FC^FAC^FC^FAC^FAC^FC^FAGC^FAAU^FC^FAAAC^FGC^FGU^FU^FU^FU^FU^FC^FAAAC^FAC^FU^F

10 GGC^FAC^FAU^FGA (SEQ. ID. NO. 10)

AAAC^FAAU^FAC^FGAC^FU^FAC^FAC^FC^FAU^FC^FAAAAGU^FAU^FU^FAU^FC^FU^FU^FGC^FAU^FC^FGAAG

GU^FU^FGGC^FA (SEQ. ID. NO. 11)

GU^FGAC^FC^FAC^FGC^FGGAU^FAAAU^FGAAU^FC^FAAAAC^FAAAC^FAAAC^FC^FAGGGC^FC^FGU^F

15 U^FC^FGAC^FU^FAC^FGC^FU^FAAU^FU^FAU^FC^FC^FC^FG (SEQ. ID. NO. 12)

o un fragmento activo de los mismos.

Además, es posible obtener fragmentos activos de los aptámeros eliminando parte de cada una de las secuencias anteriores.

Ensayos de cambio de movilidad electroforética

25 Para estudiar la interacción ARN/ DBL1 α ^{His} en disolución, se realizaron varios experimentos de EMSA. La proteína usada para estos experimentos se eluyó de manera reciente de las perlas de Ni-NTA para evitar el almacenamiento a largo plazo y la congelación en disolución para impedir la precipitación de DBL1 α ^{His}. Se marcó internamente el ARN con ³²P-ATP y se analizó la migración tras incubación con DBL1 α ^{His} o BSA en gel de poliacrilamida nativo al 10%. La banda superior (ARN de 177 nucleótido de largo) observada en la figura 4 es un producto incorrecto de la transcripción de T7 que se deriva de un molde de transcripción más largo. Este molde es un producto generado en la reacción de PCR previa (unión del cebador de PCR a un sitio de T7 externo en el vector TOPO). Con la adición de DBL1 α ^{His} al clon de ARN b02 y e05, el producto principal de 90 nt disminuye sustancialmente, mientras que la banda superior (177 nt) permanece sin cambios, lo que indica que la molécula de ARN de 177 nt no interacciona con DBL1 α ^{His}. Incluso los clones d12 y en cierto grado f11, muestran una disminución en la molécula de ARN de 90 nt cuando se incubaba con DBL1 α ^{His}. b03, un clon que generalmente mostraba una baja tasa de recuperación en la unión *in vitro* a DBL1 α ^{His} en perlas de Ni-NTA, muestra un cambio muy pequeño en la cantidad de ARN de 90 nt. A lo largo de todos los experimentos de EMSA realizados, no se observó ningún cambio de banda real (molécula de ARN unida a proteína con migración más lenta). El principal cambio de banda del ARN de 90 nt observado en la figura 5 para el clon e05 no migró en el gel sino que se mantuvo en la parte superior del gel por debajo del pocillo de carga.

Unión de aptámeros a parásitos vivos.

40 Con el fin de verificar la unión en superficie de aptámeros a parásitos vivos, se realizó un ensayo con células vivas con aptámeros marcados con fluoresceína. Se incorporaron de manera co-transcripcional los nucleótidos marcados con fluoresceína en los aptámeros de ARN. Se detectaron los aptámeros unidos en superficie usando microscopía de fluorescencia. Los resultados se resumen en la figura 6. Como control durante este experimento, se usó ARN de aptámero marcado con fluoresceína del conjunto 0 no seleccionado. Estos resultados muestran una asociación significativa entre aptámeros de ARN individuales específicos así como entre el ARN seleccionado del conjunto 8 y los eritrocitos parasitados.

Efectos de los aptámeros de ARN sobre la formación de rosetas en FCR3S1.2 *in vitro*

50 Puesto que el ensayo con células vivas usando aptámeros de ARN marcados con fluoresceína mostró asociación con el eritrocito infectado, la siguiente etapa fue analizar si esta interacción podría afectar al estado de formación de rosetas en un cultivo de sangre del clon FCR3S1.2 multiadhesivo y de alta formación de rosetas. La formación de rosetas y la citoadherencia de FCR3S1.2 son sensibles a la heparina y al sulfato de heparina y las rosetas pueden alterarse con la adición de heparina 100 μ g/ml en un cultivo con un hematocrito del 5% con una parasitemia del 5%.

Se cree que esta alteración está producida por la competencia entre GAG de tipo sulfato de heparina unido a DBL1 α y la heparina añadida en disolución. De forma similar, se investigó si los aptámeros de ARN seleccionados por SELEX pueden alterar la interacción entre DBL1 α y GAG en el eritrocito no infectado unido. Se sometieron a prueba los aptámeros en cultivos de sangre a una concentración de 2 μ g/ml (65 nM) a 12 μ g/ml (387 nM), y con ARN no seleccionado del conjunto 0 como control negativo. Se observó alteración total a 12 μ g/ml para los clones b02, d12 y e05 y se observó una disminución en la tasa de rosetas de hasta el 35% en relación con el control a 8 μ g/ml (258 nM) (la figura 7 representa el estado de las rosetas en función de la concentración). Pudo observarse un efecto a una concentración de 65 nM, ya que las rosetas gigantes disminuyeron hasta hacerse más pequeñas una vez (figura 8). El ARN del conjunto 0 no alteró las rosetas en este intervalo de concentración (65 - 387 nM), pero se observó un pequeño grado de alteración (el 5-10% menor que en las células no tratadas) a una concentración de ARN no seleccionado de 650 nM a 850 nM. Se sometió a prueba la estabilidad de los aptámeros modificados con 2'F en cultivo de sangre/suero. Tras una incubación de 3 horas, no se observó degradación evidente cuando se hicieron pasar las muestras sobre UREA-PAGE al 10% (datos no mostrados). Esto se correlaciona con el trabajo anterior realizado con ARN modificado con 2'F en sangre en el que la semivida del ARN fue de aproximadamente 15 horas.

Se acepta generalmente que la malaria grave se produce lo más probablemente por el secuestro de los eritrocitos infectados, aunque no existe ningún fármaco anti-secuestro específico disponible actualmente. PfEMP1 es una molécula clave usada por *P. falciparum* para interactuar con el huésped humano de muchas formas. La función adhesiva de esta proteína posibilita que el parásito se adhiera al revestimiento endotelial, retirando el eritrocito parasitado de la circulación periférica y evitando por tanto el aclaramiento esplénico.

Un aptámero puede unirse a su diana con afinidad extremadamente alta y se ha sugerido que son incluso más específicos que los anticuerpos. Puesto que los anticuerpos deben producirse biológicamente, lo que implicaría cultivos celulares caros y eventualmente modelos animales, los aptámeros tienen una ventaja evidente puesto que pueden producirse completamente en un tubo de ensayo. Otra ventaja con el uso de los aptámeros en comparación con el uso de anticuerpos específicos es la diferencia en tamaño. Debido a su tamaño más pequeño, los aptámeros de ARN tienen un gran potencial alcanzando estructuras más ocultas a las que los anticuerpos no pueden acceder debido a impedimento estérico. Adicionalmente, los aptámeros de ARN son fáciles de modificar químicamente y provocan poca o ninguna inmunogenicidad en aplicaciones terapéuticas. A través de la técnica de SELEX se han obtenido aptámeros contra la región semiconservada DBL1 α de PfEMP1. Este proyecto se centró en generar aptámeros de ARN, someter a prueba la capacidad de unión de diferentes aptámeros de ARN a DBL1 α con cola de His recombinante y examinar la capacidad de alteración de rosetas. De forma similar, también se ha notificado la selección *in vitro* con fragmentos de anticuerpo de cadena sencilla o peptídica usando la técnica de presentación en fago en proteínas de superficie de *P. vivax*, *P. falciparum*.

Producir la diana DBL1 α para la selección demostró ser una tarea difícil. Se realizó una serie de diferentes experimentos de optimización cambiando el tiempo de inducción, la temperatura y la concentración de IPTG, pero ninguno de los factores mencionados anteriormente pareció tener un efecto drástico sobre el rendimiento. La cantidad de proteína DBL1 α ^{His} en disolución siempre estuvo bastante limitada y la mayor parte de la proteína se encontraba en la fracción insoluble. Se ha sometido a prueba la evaluación de la calidad en la proteína purificada a partir de la fracción soluble a través de la unión al ligando heparina. A través de ocho rondas de selección en DBL1 α ^{His} recombinante, se observó un aumento importante en la recuperación de ARN y para investigar los motivos conservados dentro del ARN seleccionado, se secuenciaron y se analizaron 70 clones. Desgraciadamente, el resultado de la investigación de MEME/MAST reveló un gran número de grupos conservados más pequeños. Una estrategia para minimizar el número de grupos habría sido aumentar la presión de selección disminuyendo la concentración de ARN y DBL1 α ^{His} en las últimas rondas de selección, descartando por tanto los aptámeros de ARN con poca afinidad por la diana. El resultado sería un conjunto más homólogo de agentes de unión de ARN. Desgraciadamente, la concentración de proteína se mantuvo a \sim 1 μ M puesto que se mostró que la calidad y la solubilidad de DBL1 α ^{His} tras la elución y la diálisis eran escasas. Otro enfoque para aumentar la afinidad y, lo que es más importante, para obtener aptámeros biológicos relevantes, sería cribar los aptámeros seleccionados con DBL1 α ^{His} en eritrocitos infectados vivos. Se sometió a prueba este enfoque incubando un cultivo enriquecido de FCR3S1.2 (parasitemia del 70-80%) con un conjunto de ocho ARN y aislando el ARN unido en superficie mediante digestión con tripsina. Se pensó que los resultados no fueron satisfactorios y se descartó este enfoque. La variación y la gran cantidad de huérfanos entre los 70 clones secuenciados pudo ser el resultado de la naturaleza "adherente" de DBL1 α debido a su sitio de unión a sulfato de heparina y a la carga positiva global. Las moléculas de ARN, aunque adoptan una estructura en horquilla doble estable con la adición de la naturaleza de carga negativa de la molécula de ARN, podían imitar teóricamente a la molécula de heparina con su estructura principal de azúcar y sulfatos negativos en lugar del fosfato del ARN y unirse de la misma manera al dominio de unión a GAG de DBL1 α con una baja constante K_D . Entre los clones sometidos a prueba; b02, d12 y e05 parecieron ser estables con respecto a la unión a DBL1 α ^{His}. Estos aptámeros presentaron asociación a la proteína cuando se incubaron con DBL1 α ^{His} a una concentración de 400 nM, lo que se correlaciona con los resultados obtenidos durante los experimentos de EMSA. En ocasiones, el cambio de banda observado en estos experimentos mostró que el ARN quedaba retenido en la parte superior del gel en presencia de DBL1 α ^{His}. Se cree que el ARN se une a DBL en un gran complejo que no migra debido a la carga positiva y al bajo grado de solubilidad de la proteína.

Con el fin de verificar si la unión ARN/proteína tenía alguna relevancia biológica, se marcaron los tres clones con fluoresceína y se incubaron con parásitos FCR3S1.2 vivos. Las imágenes con fluoresceína se fusionaron con imágenes de los núcleos teñidos con DAPI. Los resultados muestran la co-localización entre el ARN marcado con fluoresceína y los núcleos teñidos con DAPI. Los resultados reunidos a partir de este ensayo muestran una especificidad significativa entre los clones de aptámero seleccionados y la superficie del eritrocito infectado en comparación con la asociación entre el ARN no seleccionado y el eritrocito infectado. Un método alternativo para un ensayo con células vivas basado en fluoresceína sería marcar en los extremos el aptámero modificado con 2'F con biotina manteniendo de ese modo la modificación en UTP y CTP. Esto potencia enormemente la estabilidad en el cultivo en sangre/suero. Cambiar 2'F-d(CU)TP por (CU)TP también obligaría un pequeño cambio conformacional en el ARN, disminuyendo de ese modo la afinidad en comparación con el ARN modificado con 2'F original. El átomo de 2'F podría desempeñar un papel directo en la unión a través de la interacción con residuos de aminoácido en DBL1 α . Cuando se realiza el ensayo con células vivas, las rosetas no se alteran manualmente antes de la adición del aptámero. La formación de rosetas podría evitar la unión de los aptámeros marcados al DBL1 α expuesto sobre la superficie a medida que se une la proteína y se ocupa el espacio por la molécula de GAG. Aunque si los aptámeros tienen una afinidad superior por DBL1 α que la molécula de GAG, podrían ser capaces de competir con la unión y de ese modo excluir y alterar la interacción GAG/DBL1 α , visualizada como rosetas alteradas. Esto se sometió a prueba para los tres clones seleccionados por SELEX, b02, d12 y e05. Todos ellos pudieron alterar rosetas en un cultivo *in vitro* de FCR3S1.2. Una concentración de tan solo 65 nM tuvo un efecto limitado sobre la tasa de rosetas *per se*, sin embargo sí tuvo un efecto evidente en lo que se refería a disminuir el tamaño de las rosetas. Si se incluye el tamaño de una roseta como indicador del estado de la roseta en el cultivo, el efecto se hace mucho más evidente. A una concentración de aptámero de 260 nM, la tasa de rosetas disminuyó hasta aproximadamente el 35% del control y una concentración de 387 nM fue suficiente para alterar completamente las rosetas dando lugar a eritrocitos infectados individuales sin eritrocitos unidos. El ARN no seleccionado no tuvo ningún efecto a esas concentraciones, pero un aumento hasta 650-850 nM mostró un ligero efecto (alteración del 5-10%). La causa de este efecto nunca se investigó. En el caso de la capacidad de la heparina para alterar rosetas de FCR3S1.2, se observó una reducción de desde el 100% hasta el 20% a una concentración de 100 μ g/ml en el trabajo de Vogt *et al.*, que es aproximadamente 7 μ M (heparina \sim 15 kDa). El ARN seleccionado tiene la capacidad de alterar rosetas a una concentración 15 veces inferior que la heparina. Se sometió a prueba el clon e02 para determinar la capacidad de alterar rosetas. Este clon tiene un efecto mínimo sobre el estado de las rosetas a 260 nM. Un hecho interesante sobre este clon es que la predicción de MFold realizada en la región aleatoria de 50 nt no tiene estructura secundaria mientras que los clones b02, d12 y e05 muestran estructuras secundarias complejas. Los aptámeros sometidos a prueba en este estudio tenían 90 nt con un peso aproximado de 31 kDa. Las regiones flanqueantes fijas de 2 x 20 nt para la transcripción de ARN de T7 y la unión al cebador se incluyen en las estructuras. No se cree que éstas sean importantes para la unión y por tanto los aptámeros activos aislados en este estudio podían truncarse hasta 40 - 50 nt o incluso menos una vez realizado el trabajo adicional para elucidar las regiones de los aptámeros que son importantes para la unión. Las estructuras dadas de los aptámeros son sólo teóricas y debe realizarse la obtención de huella genética de ARN para verificar la estructura secundaria del ARN dado. Para resumir, los resultados descritos demuestran que los aptámeros específicos para DBL1 tienen potencial para localizar el DBL1 sobre la superficie de los eritrocitos infectados para la obtención de imágenes IFA. Y lo que es más importante, los aptámeros podían usarse como fármaco anti-formación de rosetas novedoso. La siguiente etapa sería someter a prueba los aptámeros para determinar la alteración de rosetas y el secuestro de parásitos en un modelo animal tal como rata para comprobar si los aptámeros son activos *in vivo*. Puesto que se está expandiendo el campo de los aptámeros como fármacos terapéuticos, se ha obtenido mucho conocimiento sobre cómo aumentar la estabilidad y la actividad de los aptámeros *in vivo*. Esto facilita enormemente el éxito en cualquier trabajo futuro realizado en aptámeros en una situación *in vivo*. Finalmente, debe observarse que el enfoque experimental podría tener un espectro de aplicación mucho más amplio, especialmente en el caso de patógenos extracelulares en los que no se requiere la administración del fármaco a través de membranas.

50 Cultivo de *Plasmodium falciparum*.

Se cultivaron parásitos en fase sanguínea de *P. falciparum* cepa FCR3S1.2 según métodos convencionales con un 10% de suero AB*Rh* añadido al medio tamponado (RPMI complementado con HEPES, gentamicina y bicarbonato de sodio).

55 Expresión de proteínas en *E. coli*.

Se expresó DBL1 α ^{His} recombinante a partir de FCR3S1.2 tal como sigue. Se hicieron crecer células SG13009 (pREP4) de Qiagen que albergaban plásmidos pQE-TriSystem *His-Strep* 2 (DBL1 α ^{His}), o pQE-60 (DBL1 α ^{His}) en medio LB que contenía ampicilina (100 μ g/ml) y kanamicina (30 μ g/ml) o bien a 22°C o bien a 37°C. A DO₆₀₀ = 0,8 se indujeron las células con IPTG 0,1 mM durante 3 h; se recogió 1 litro de suspensión celular (4°C, 25 min, 3000 g) y se resuspendió en 25 ml de tampón de lisis (NaH₂PO₄ 50 mM/NaOH pH 7,4, NaCl 300 mM, PMSF 1 mM (Sigma) Triton X-100 al 0,05%, imidazol 10 mM). Se incubaron las células con Lysozyme en hielo durante 30 min y se sonicaron. Se retiró el desecho de células insolubles mediante centrifugación (4°C, 30 min, 18.000 g). Se trató el sobrenadante con ADNasa y se incubó con 1 ml perlas de Ni-NTA agarosa (Qiagen) durante 2 h a 4°C con agitación

suave. Se sedimentaron las perlas a 100 x g durante 3 min y se lavaron 3 veces con 15 ml de tampón de lavado (NaH₂PO₄ 50 mM/NaOH pH 7,4, NaCl 300 mM, Triton X-100 al 0,05%, imidazol 30 mM). Se eluyó la proteína unida con imidazol 400 mM (Sigma), NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 300 mM que se retiró posteriormente mediante diálisis con tampón de PBS con Triton X-100 al 0,05% durante 18 h a 4°C. Se estimó la pureza de la proteína haciendo pasar las muestras sobre SDS-PAGE al 10% y finalmente se determinó la concentración de proteína (Bradford 1976). Alternativamente, se purificó DBL1 α con cola de His en FPLC. Se cargó la fracción soluble extraída de *E. coli* en una columna de Ni en FPLC (Amersham Biosciences) con una velocidad de flujo de 0,5 ml/min. Se lavó la proteína unida con gradiente de imidazol 5-70 mM (60 ml a 1 ml/min). Se eluyó la proteína con imidazol 400 mM y se analizó tal como se describió anteriormente. Todos los productos químicos se obtuvieron de Sigma.

Selección *in vitro* - SELEX.

Se generó la biblioteca de ADN mencionada anteriormente usando el oligonucleótido B (5'-CGACTGCAGAGCTTGCTACG(N)₅₀GGTACCGAGCTCGAATTCCC-3') (SEQ. ID. NO. 19) y el oligonucleótido A (5'-GCGTAATACGACTCACTATAGGGAATTCGAGCTCGGTACC-3') (SEQ. ID. NO. 20) (secuencia para el promotor de T7 subrayada). Los oligonucleótidos se sintetizaron y se adquirieron de IBA, Alemania. El oligonucleótido B contiene una secuencia central de 50 nucleótidos aleatorizados flanqueados por regiones constantes para hibridarse con el oligonucleótido A y un sitio de cebador para transcripción inversa. Se creó la biblioteca de ADN bicatenario hibridando 3 μ M de oligonucleótido A y oligonucleótido B (95°C durante 5 min y enfriando 15 min a 25°C), añadiendo posteriormente fragmento Klenow (Fermentas) en tampón Klenow (Fermentas) a 37°C durante 2 h. Se purificó el ADNbc mediante columna Ym-30 microcon (Millipore) y se eluyó en 30 μ l de agua libre de ARNasa. Se creó la biblioteca modificada con 2'F mediante transcripción de ARN de T7 de 40 μ g de molde usando polimerasa de T7 (Epicentre) en tampón de transcripción suministrado añadiendo DTT (Epicentre) a 10 mM y ATP, GTP, 2'F-dCTP, 2'F-dUTP (Epicentre) a 1,25 mM. Se marcó el ARN añadiendo 0,37 MBq de [α -³²P]-ATP (Amersham Biosciences) en 20 μ l de volumen de reacción. La reacción discurrió a 37°C durante 5 h y se precipitó ADN/ARN usando NaOAc 0,2 M, EtOH al 70%. La muestra se procesó en un 10% de UREA-PAGE 8 M y se cortó el ARN radiactivo del gel y se purificó mediante trituración y empapado con NaOAc 1 M (pH=4,7) durante la noche. Tras centrifugación con lana de vidrio, se precipitó el ARN (EtOH al 70% y glucógeno hasta el 0,05%).

El primer ciclo de selección se realizó con 30 μ g (1 nmol) de 2'F-ARN marcado radiactivamente y un mínimo de 60 μ g (1, 3 nmol) de DBL1 α purificado. Se realizaron ciclos posteriores con aproximadamente 300 pmol de ARN y cantidades variables de proteína de desde 20 μ g hasta 60 μ g. Se unió el DBL1 α con cola de His a Ni-NTA agarosa (Qiagen) en los ciclos 1-4 y 7-8 y a perlas magnéticas de Ni-NTA (Qiagen) en los ciclos 5 y 6. La concentración de proteína y ARN fue de 800 nM a 1,2 μ M con razones variables entre ARN/proteína (1:1-4). Este intervalo de concentración se elige ya que otras moléculas que se supone que funcionan de manera similar, por ejemplo sulfato de heparina, dan los mismos valores a una concentración 10 veces superior. Se realizó una preselección en 100 μ l de Ni-NTA agarosa en cada ciclo antes de la incubación con DBL1 α para evitar el enriquecimiento de aglutinantes de matriz. Se realizó la incubación de ARN con DBL1 α a 37°C con agitación suave durante 60 min en los primeros ciclos y 20 min en los últimos ciclos. Se lavaron las perlas con 2 x 500 μ l de PBSM y se eluyó el ARN/proteína con urea 7 M, imidazol 400 mM, NaH₂PO₄ 50 mM (pH=7,4). Se extrajo el ARN usando fenol/cloroformo y se precipitó con NaOAc/EtOH. Se determinó la recuperación de ARN en cada ciclo midiendo la radioactividad de todas las fracciones recogidas durante el experimento usando un detector de centelleo.

Se estimó la concentración de ARN usando Nanodrop y se generó ADNmc añadiendo el cebador B (5'-CGACTGCAGAGCTTGCTACG-3') en exceso y 20 unidades de M-MuLV-RT (Fermentas) en tampón suministrado y dNTP 1 mM. La reacción discurrió a 37°C durante 2 h. Se degradó parcialmente el 2'F-ARN mediante la adición de NaOH 0,1 M a 37°C durante 30 min. Se purificó el ADNmc usando una columna Ym-30 microcon y se determinó la concentración usando Nanodrop. Al ADNmc se le añadió oligonucleótido A en una razón de 1:1. Tras la hibridación de los dos oligonucleótidos, se creó ADNbc de longitud completa mediante relleno con Klenow. Se amplificó el ADNbc mediante PCR usando Taq ADN polimerasa (Fermentas) usando un máximo de 14 ciclos usando el cebador A (5'-GCGTAATACGACTCACTATAG-3') y el cebador B. Se reunió el producto de la PCR y se purificó y se usó como molde para el siguiente ciclo de SELEX.

Clonación y secuenciación del aptámero de ARN.

Se clonó ADNbc amplificado por PCR del conjunto 8 en el vector TOPO pCR[®]4 o pCR[®]2.1 de Invitrogen y se transformó en *E. coli* cepa Top10 (Invitrogen). Se extendieron las células sobre agar LB con ampicilina 100 μ g/ml y 5-bromo-4-cloro-3-indolil-b-D-galactopiranosido (X-Gal) 30 μ g/ml. Se aislaron las colonias blancas y se confirmó el inserto mediante PCR de colonias usando el cebador directo e inverso M13. Se sembraron en estrías los clones positivos en una placa de 96 pocillos y se enviaron a AGOWA (Alemania) para su secuenciación usando el cebador M13. Se alinearon 70 secuencias y se examinaron para determinar los motivos conservados usando el sistema de búsqueda y descubrimiento de motivos MEME/MAST, versión 3.5.4. (<http://meme.sdsc.edu/meme>).

Transcripción de aptámeros individuales y su unión a DBL1 α ^{His}.

Se recogieron clones individuales de *E. coli* clones de la placa de LB-amp y se hicieron crecer en 5 ml de LB-amp (100 µg/ml) a 37°C durante la noche. Se aisló el plásmido usando el kit miniprep (Sigma) en 3 ml de cultivo celular. Se eluyó el plásmido en 100 µl de agua. Se generó un molde de transcripción usando el cebador A y el cebador B para PCR. Antes de la amplificación por PCR se escindió el vector con Not I para evitar la producción de productos de PCR incorrectos. Se purificó el producto de PCR mediante centrifugación en una columna Ym-30 (Millipore). Se realizó la transcripción mediante T7 de 500 ng de molde de ADNbc en 20 µl con 2'F-dNTP 1,25 mM (Epicentre) y NTP (Fermentas), DTT 10 mM (Epicentre), 0,37 Mbp de [α -³²P]-ATP (Amersham Bioscience) que discurrió a 37°C durante 3 h. Se digirió el molde usando 1 unidad de ADNasa a 37°C durante 15 min. Se purificó el ARN usando MICROCON[®]. Se determinó la concentración de ARN usando NanoDrop.

Ensayo de cambio de movilidad electroforética.

Se incubaron 25-30 ng de ARN marcado internamente con ³²P-[α -ATP] en un volumen de 18 µl con 4 - 5 µl (~300 ng) de DBL1 α ^{His} recién eluido y se añadieron 3 µg de ARN de levadura en PBSM. Se incubó una muestra sin DBL1 α ^{His} en presencia de 10 µg de BSA y se añadieron 4 - 5 µl de tampón de elución de imidazol 400 mM a la muestra de BSA de modo que el control fue idéntico a la muestra incubada con DBL1 α . Se incubaron las muestras a 37°C durante 10 min y se añadió tampón de carga 6x (Maniatis). Se cargaron 10 µl de muestra en un gel de PAA al 10% de 1 mm de grosor y se hicieron correr a 80 V durante 30 min y luego se hicieron correr a 200 V hasta que el colorante de migración inferior (azul de bromofenol) se había salido del gel. Se expuso la placa de obtención de imágenes de fluorescencia (Brand) durante la noche y se analizó la placa en un sistema de detección y cuantificación de imágenes de fluorescencia Storm.

Marcaje con fluoresceína del aptámero.

Se marcó el aptámero de ARN de manera co-transcripcional con fluoresceína. La mezcla de transcripción contenía mezcla de marcaje de NTP (ATP 10 mM, CTP 10 mM, GTP 10 mM, UTP 6,5 mM y fluoresceína-12-UTP 3,5 mM, pH 7,5) (Roche Applied Science), tampón de transcripción de T7 5x, 2 µl de polimerasa de T7 (50 U/µl, Fermentas), dH₂O estéril libre de ARNasa (Fluka) y 200 ng de ADN de molde por 20 µl de reacción. Se llevó a cabo la reacción a 37°C durante 2 h. El producto de la transcripción se trató con ADNasa (New England BioLabs Inc); se precipitó dos veces con EtOH/NaOAc y se purificó usando MICROCON[®] (MILLIPORE).

Ensayo con célula vivas, microscopía de fluorescencia y obtención de imágenes.

Se cultivaron parásitos de *P. falciparum* (cepa FCR3S1.2) hasta la fase de trofozoito y se ajustó hasta una parasitemia del 4 - 5%. Se lavaron los eritrocitos parasitados (PE) dos veces con PBS estéril, se desechó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en aproximadamente 200 µl de PBS estéril. Para el ensayo con células vivas, se prepararon monocapas en portaobjetos adhesivos (Marienfeld Glassware) según el protocolo del fabricante. Las células cargadas negativamente se unen a estos portaobjetos basándose en la adhesión electrostática sin etapas de fijación adicionales lo que permite la investigación de los eritrocitos parasitados vivos en fase tardía. Se lavaron las células con PBS estéril y se añadieron 500 ng de la muestra de ARN disuelta en 20 µl de PBS, BSA al 1% y se permitió que se incubara durante 30 minutos. Como control negativo en este experimento, se usó el aptámero de ARN del conjunto 0. Se retiró el ARN no unido lavando con PBS estéril y se añadió medio de montaje Vectasheild[®] con DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindol) (Vector). Todas las incubaciones se llevaron a cabo a temperatura ambiente en una cámara húmeda. Se analizaron los portaobjetos con lentes de inmersión en aceite 100x en un microscopio UV Nikon Optiphot 2.

Ensayo de alteración de la formación de rosetas.

Se eluyeron muestras de ARN para el ensayo de alteración con agua y MgCl₂ 1 mM. Se cultivó *Plasmodium falciparum* cepa FCR3S1.2 hasta una parasitemia del 4-5% en hematocrito del 5% usando la técnica de vela en frasco (ref. Vogt). Se mezcló el cultivo celular con las muestras de ARN hasta un volumen final de 100 µl en concentraciones de desde 130 nM hasta 750 nM. Se obtuvieron controles negativos o bien con la adición de agua/MgCl₂ o bien con el ARN no seleccionado generado con la transcripción de T7 a partir ADNbc del conjunto 0 no seleccionado. Se incubaron los parásitos desde 1 hasta 2½ horas a temperatura ambiente con agitación suave. Se mezcló el cultivo con RPMI/naranja de acridina y se analizó usando un microscopio para determinar el estado de formación de rosetas. Se realizó el recuento de manera ciega y no sesgada y se contó un mínimo de 400 parásitos para cada muestra. Los parásitos que formaban rosetas se identificaron como eritrocitos infectados con más de 2 eritrocitos no infectados unidos. Tras la auto-aglutinación, se contó cada parásito individual en una agrupación como parásito que formaba rosetas. Se calculó la tasa de formación de rosetas como (parásitos que formaban rosetas/(parásitos que formaban rosetas + parásitos que no formaban rosetas) x 100).

Pudo demostrarse la capacidad de alteración de rosetas en estos aptámeros obtenidos mediante SELEX a concentraciones de 33 nM y con una alteración del 100% a 387 nM. Además, tienen una semivida en suero de 20 h.

Unión de aptámeros a GST-DBL1 α . Para confirmar que la interacción de los nuevos aptámeros con la proteína era

específica, se diseñó un experimento adicional. ARN no marcado iba a competir con ARN marcado en 5' de manera radiactiva por la unión a una proteína de fusión GST-DBL1 α . La recuperación del ARN marcado disminuye en un 40% con la adición de un exceso molar de 30 veces del ARN no marcado. Los dos controles negativos en el experimento, el ARN no seleccionado (conjunto 0) y e02, dieron una recuperación inferior del 85-90% en comparación con b02, d12, e05.

Para confirmar adicionalmente que la disminución observada es específica, se incubó d12 marcado radiactivamente en presencia de un exceso molar de 30 veces de e02 y el conjunto 0. No se observó disminución con la adición de ARN a partir de estos dos conjuntos. Además, se demostró una disminución adicional de desde el 40% hasta el 60% de ARN marcado cuando se añadió un exceso molar de 45 veces del ARN de d12 no marcado.

Unión de aptámeros a la superficie de eritrocitos infectados. Como los aptámeros seleccionados estaban uniéndose al dominio DBL1 α recombinante, la siguiente etapa fue verificar y podían asociarse a la superficie del eritrocito infectado. Se compararon dos de estos aptámeros con el ARN no seleccionado del conjunto 0 y el aptámero de no unión e02. Se marcaron en los extremos cantidades molares iguales de ARN con ³²P y se incubaron con un cultivo con parasitemia del 5% de FCR3S1.2. Los resultados demuestran que el ARN seleccionado se retenía 4 veces más que el ARN del conjunto no seleccionado o del aptámero de no unión e02.

Las composiciones terapéuticas o farmacológicas de la presente invención comprenderán generalmente una cantidad eficaz del/de los componente(s) activo(s) de la terapia, disuelto(s) o disperso(s) en un medio farmacéuticamente aceptable. Los medios o portadores farmacéuticamente aceptables incluyen todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes de retardo de la absorción e isotónicos y similares. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticas activas se conoce bien en la técnica. También pueden incorporarse principios activos complementarios en las composiciones terapéuticas de la presente invención.

La preparación de composiciones farmacéuticas o farmacológicas se conocerá bien por los expertos en la técnica a la luz de la presente divulgación. Normalmente, tales composiciones pueden prepararse como inyectables, o bien como disoluciones o bien como suspensiones líquidas; formas sólidas adecuadas para disolución en, o suspensión en, líquido antes de la inyección; como comprimidos u otros sólidos para administración oral; como cápsulas de liberación temporal; o bien en cualquier otra forma usada actualmente, incluyendo gotas, cremas, lociones, bálsamos, inhalantes, y similares. También puede ser particularmente útil el uso de formulaciones estériles, tales como lavados basados en solución salina, por parte de cirujanos, médicos o trabajadores sanitarios para tratar una zona particular en el campo de actuación. También pueden administrarse las composiciones a través de un microdispositivo, micropartícula o esponja.

Tras la formulación, los agentes terapéuticos se administrarán de forma compatible con la formulación de dosificación y en una cantidad tal que sea farmacológicamente eficaz. Las formulaciones se administran fácilmente en una variedad de formas farmacéuticas, tales como el tipo de disoluciones inyectables descritas anteriormente, pero también pueden emplearse cápsulas de liberación de fármacos y similares.

En este contexto, la cantidad de principio activo y el volumen de la composición que ha de administrarse dependen del animal huésped que va a tratarse. Las cantidades precisas de compuesto activo requeridas para su administración dependen del criterio del médico y son particulares para cada individuo.

Normalmente se utiliza un volumen mínimo de una composición requerido para dispersar los compuestos activos. Los regímenes adecuados para la administración también son variables, pero se tipificarían administrando inicialmente el compuesto y monitorizando los resultados y luego administrando dosis controladas adicionales a intervalos adicionales.

Por ejemplo, para la administración oral en forma de un comprimido o una cápsula (por ejemplo, una cápsula de gelatina), el componente de fármaco activo puede combinarse con un portador inerte farmacéuticamente aceptable, oral, no tóxico tal como etanol, glicerol, agua y similares. Además, cuando se desee o sea necesario, también pueden incorporarse a la mezcla aglutinantes, lubricantes, agentes disgregantes y agentes colorantes adecuados. Los aglutinantes adecuados incluyen almidón, silicato de aluminio y magnesio, pasta de almidón, gelatina, metilcelulosa, carboximetilcelulosa de solio y/o polivinilpirrolidona, azúcares naturales tales como glucosa o beta-lactosa, edulcorantes de maíz, gomas naturales y sintéticas tales como goma arábica, tragacanto o alginato de sodio, polietilenglicol, ceras y similares. Los lubricantes usados en estas formas farmacéuticas incluyen oleato de sodio, estearato de sodio, estearato de magnesio, benzoato de sodio, acetato de sodio, cloruro de sodio, sílice, talco, ácido esteárico, su sal de magnesio o calcio y/o polietilenglicol, y similares. Los disgregantes incluyen, sin limitación, almidón, metilcelulosa, agar, bentonita, almidones de goma xantana, agar, ácido alginico o su sal de sodio, o mezclas efervescentes, y similares. Los diluyentes incluyen, por ejemplo, lactosa, dextrosa, sacarosa, manitol, sorbitol, celulosa y/o glicina.

Los compuestos de la invención también pueden administrarse en formas farmacéuticas orales tales como comprimidos o cápsulas, píldoras, polvos, gránulos, elixires, tinturas, suspensiones, jarabes y emulsiones de

liberación temporal y liberación sostenida.

Las composiciones inyectables son preferiblemente disoluciones o suspensiones isotónicas acuosas, y ventajosamente se preparan supositorios a partir de emulsiones o suspensiones grasas. Las composiciones pueden esterilizarse y/o contener adyuvantes, tales como agentes conservantes, estabilizantes, humectantes o emulsionantes, promotores de la disolución, sales para regular la presión osmótica y/o tampones. Además, también pueden contener otras sustancias terapéuticamente valiosas. Las composiciones se preparan según métodos de mezclado, granulación o recubrimiento convencionales, respectivamente, y normalmente contienen de aproximadamente el 0,1 al 75%, de manera preferible de aproximadamente el 1 al 50%, del principio activo.

Las composiciones líquidas, particularmente las inyectables, pueden prepararse por ejemplo mediante disolución, dispersión, etc. El compuesto activo se disuelve en o se mezcla con un disolvente farmacéuticamente puro tal como, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa acuosa, glicerol, etanol, y similares, para formar de ese modo la disolución o suspensión inyectable. Adicionalmente, pueden formularse formas sólidas adecuadas para disolverse en líquido antes de la inyección.

Los compuestos de la presente invención pueden administrarse en forma intravenosa (tanto en bolo como en infusión), intraperitoneal, subcutánea o intramuscular, usando todas formas bien conocidas por los expertos habituales en las técnicas farmacéuticas. Los inyectables pueden prepararse en formas convencionales, o bien como disoluciones o bien como suspensiones líquidas.

Además, los compuestos preferidos para la presente invención pueden administrarse en forma intranasal a través del uso tópico de inhalantes, vehículos intranasales adecuados, o a través de vías transdérmicas, usando las formas de parches cutáneos transdérmicos bien conocidos por los expertos habituales en la técnica. Para administrarse en forma de un sistema de administración transdérmico, la administración de la dosificación será naturalmente continua más que intermitente a lo largo de todo el régimen de dosificación. Otras preparaciones tópicas preferidas incluyen cremas, ungüentos, lociones, pulverizaciones en aerosol y geles, en las que la concentración de principio activo oscilaría normalmente entre el 0,01% y el 15%, p/p o p/v.

Para las composiciones sólidas, pueden usarse excipientes que incluyen calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, talco, celulosa, glucosa, sacarosa, carbonato de magnesio, y similares. El compuesto activo definido anteriormente también puede formularse como supositorios usando por ejemplo, polialquilenglicoles, por ejemplo, propilenglicol, como portador. En algunas realizaciones, los supositorios se preparan ventajosamente a partir de emulsiones o suspensiones grasas.

Los compuestos de la presente invención también pueden administrarse en forma de sistemas de administración en liposomas, tales como vesículas unilamelares pequeñas, vesículas unilamelares grandes y vesículas multilamelares. Los liposomas pueden formarse a partir de una variedad de fosfolípidos, que contienen colesterol, estearilamina o fosfatidilcolinas, en algunas realizaciones se hidrata una película de componentes lipídicos con una disolución acuosa del fármaco para dar una forma de capa lipídica que encapsula el fármaco, tal como se describe en la patente estadounidense n.º 5.262.564. Por ejemplo, las moléculas de aptámero descritas en el presente documento pueden proporcionarse como un complejo con un compuesto lipófilo o un compuesto de alto peso molecular, no inmunogénico construido usando métodos conocidos en la técnica. Un ejemplo de complejos asociados con ácido nucleico se proporciona en la patente estadounidense n.º 6.011.020.

Los compuestos de la presente invención también pueden acoplarse con polímeros solubles como portadores de fármacos direccionables. Tales polímeros pueden incluir polivinilpirrolidona, copolímero de pirano, polihidroxipropilmetacrilamida-fenol, polihidroxietil-aspanamida-fenol, o polietileno oxidopolilisina sustituida con residuos de palmitoílo. Además, los compuestos de la presente invención pueden acoplarse a una clase de polímeros biodegradables útiles para lograr la liberación controlada de un fármaco, por ejemplo, poli(ácido láctico), poliépsilon caprolactona, poli(ácido hidroxibutírico), poliortoésteres, poliacetales, polidihidropiranos, policianoacrilatos y copolímeros reticulados o de bloque anfipáticos de hidrogeles.

Los compuestos de la invención también pueden administrarse al tejido a través de la sangre y el fluido sistémicos a los tejidos y por tanto se administra mediante inyección sistémica parenteral, mediante las vías de administración intravenosa, intramuscular o subcutánea. La administración a través de inyección de composiciones farmacéuticas de la invención puede ser útil como complemento a la administración sistémica de un agente terapéutico para el tratamiento de la malaria y/o enfermedades sistémicas con tales manifestaciones.

Los compuestos de la presente invención también pueden administrarse al tejido en formulación de polímero o de gel de liberación sostenida o en depósito mediante la implantación quirúrgica de un sistema de polímero de tamaño microscópico biodegradable, por ejemplo, un microdispositivo, una micropartícula o una esponja, u otros dispositivos transescleróticos de liberación lenta, implantado durante el tratamiento de una enfermedad, o mediante un dispositivo de administración, por ejemplo un dispositivo de administración sostenida de polímeros. Los compuestos de la invención también pueden administrarse el tejido por vía tópica, por ejemplo, en forma de gotas cargadas con el compuesto de la invención, o mediante iontoforesis usando corriente eléctrica para dirigir el fármaco desde la

superficie hasta el tejido.

Si se desea, la composición farmacéutica que va a administrarse también puede contener cantidades minoritarias de sustancias auxiliares no tóxicas tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes tamponantes del pH y otras sustancias tales como, por ejemplo, acetato de sodio y oleato de trietanolamina.

El régimen de dosificación que utilizan los aptámeros se selecciona según una variedad de factores incluyendo tipo, especie, edad, peso, sexo y estado médico del paciente; la gravedad del estado que va a tratarse; la vía de administración; la función renal y hepática del paciente; y el aptámero particular o la sal del mismo empleado. Un médico experto habitual puede determinar y recetar fácilmente la cantidad eficaz del fármaco requerida para prevenir, contrarrestar o detener el avance del estado.

Las dosificaciones orales de las composiciones de aptámero de la presente invención, cuando se usan para los efectos indicados, oscilarán entre aproximadamente 0,05 y 7500 mg/día por vía oral. Las composiciones se proporcionan preferiblemente en forma de comprimidos ranurados que contienen 0,5, 1,0, 2,5, 5,0, 10,0, 15,0, 25,0, 50,0, 100,0, 250,0, 500,0 y 1000,0 mg de principio activo. Los compuestos de la presente invención pueden administrarse en una dosis diaria única, o la dosificación diaria total puede administrarse en dosis divididas de dos, tres o cuatro veces al día.

Las dosificaciones infundidas, las dosificaciones intranasales y las dosificaciones transdérmicas de las composiciones de aptámero de la presente invención oscilarán entre 0,05 y 7500 mg/día. Las dosificaciones subcutáneas, intravenosas e intraperitoneales de las composiciones de aptámero de la presente invención oscilarán entre 0,05 y 3800 mg/día.

Las dosificaciones cerebrales de las composiciones de aptámero de la presente invención oscilarán entre 0,001 y 10 mg administrados por ejemplo mediante inyección, desde una vez a la semana hasta una vez cada tres meses o mediante un dispositivo o formulación de liberación sostenida.

Los niveles plasmáticos eficaces de los compuestos de aptámero de la presente invención oscilan entre 0,002 mg/ml y 50 mg/ml. Los niveles cerebrales eficaces de los compuestos de aptámero de la invención pueden oscilar entre 20 nM y 250 μ M. Una concentración de 33 nM es suficiente para proporcionar una capacidad de alteración, mientras que 380 nM proporcionarán una alteración del 100% cuando procede de las SEQ. ID. NO 6 a 9 de aptámeros y las SEQ. ID. NO 10 a 12 fluoradas correspondientes.

Leyendas de las figuras

Figura 1. Purificación con Ni-NTA agarosa de DBL1 α con cola de His expresado en *E. coli*. Se indujeron las células con IPTG 100 μ M a DO₆₀₀ = 1,2 y se hicieron crecer durante tres horas. Se lisaron las células con sonicación en imidazol 10 mM y Triton X-100 al 0,1%. Se lavaron las perlas de Ni-NTA agarosa con imidazol de 20 mM a 90 mM y se eluyó la proteína unida en tampón fosfato con imidazol 400 mM.

Figura 2. Selección *in vitro* usando una biblioteca de secuencias de ARN aleatorias con sustitución de 2'-F en UTP y CTP en DBL1 α purificado unido a o bien Ni-NTA agarosa o bien perlas magnéticas de Ni-NTA. Se realizó la selección en tampón de PBS que contenía MgCl₂ 1 mM con aproximadamente proteína 1 μ M proteína y ARN en una razón de 2:1, a 37°C y con incubación de 30 minutos. El ARN unido se extrajo con fenol-cloroformo y se convirtió en ADNbc mediante reacción de transcripción inversa y relleno con Klenow, seguido por amplificación por PCR.

Figura 3. La unión del ARN marcado radiactivamente en DBL1 α ^{His} purificado de *E. coli*. Se incubó 2'-F-ARN marcado con ³²P 40 mM 45 min a 37°C con agitación con DBL1 α ^{His} 350-400 nM en 800 μ l de PBSM al que se suministraron 600 μ g de ARN de levadura. Se lavaron las perlas con 2 x 1 ml de PBS y se eluyó el ARN/DBL1 α ^{His} unido con imidazol 500 mM. Se estimaron todas las fracciones recogidas y la recuperación de ARN mediante recuento de centello.

Figura 4. Ensayo de cambio de movilidad de clones seleccionados incubados en presencia de DBL1 α ^{His}. Se incubaron 25-30 ng de ARN marcado con ³²P-[α ATP] interno 10 min con ~300 ng de DBL1 α ^{His} y se hicieron correr en gel de PAA tamponado con TBE al 10% (+). En el control negativo (-) se incubaron 25-30 ng de ³²P-[α ATP] interno con 10 μ g de BSA y se cargaron en el gel.

Figura 5. Ensayo de cambio de movilidad del clon seleccionado e05. Se incubaron ~30 ng de ARN marcado con ³²P-[α ATP] interno con ~300-400 ng de DBL1 α ^{His} durante 10 min y se cargaron en gel de PAA tamponado con TBE al 10% (+) junto con control negativo (-) incubado en presencia de 10 μ g de BSA.

Figura 6. Análisis del ensayo con células vivas en microscopía de fluorescencia. (a) ARN marcado con fluoresceína del conjunto 8 asociado con eritrocitos parasitados teñidos con DAPI. La misma asociación de ARN marcado con fluoresceína no es perceptible con eritrocitos no parasitados que se observan como parches negros. (b) Un

fragmento de la imagen anterior. (c) Aunque el ARN marcado con fluoresceína procedente del conjunto 0 está asociado en cierta medida a eritrocitos parasitados teñidos con DAPI, casi no se distingue de la asociación entre el parásito y el ARN del conjunto 8.

5 Figura 7. Figura preliminar del efecto de alteración de la formación de rosetas de los clones e05 y b02 en comparación con el ARN no seleccionado del conjunto 0. En la figura final se presenta la concentración de aptámero en el eje x con 1 ó 2-4-8-12 µg/ml e incluye e02 como aptámero sin efecto evidente.

10 Figura 8. Muestra el estado de control y de rosetas alteradas. Alteración de rosetas de FCR3S1.2. Microscopía de fluorescencia de las células teñidas con naranja de acridina con ampliación 40x o 20x. Las imágenes (a) y (c) son células control que se han incubado con 2 µl de agua en 98 µl de células durante una hora. (b) y (d) son células tratadas con 2 µl (800 ng) de 2'F-ARN procedente del clon d12 obtenido mediante SELEX. En la imagen (c) una roseta gigante está rodeada por un círculo.

15 **Lista de secuencias**

SEQ. ID. NO. 1

UGCCAACCUUCGAUGCAAGAUAAUACUUUUGAUGGUGUAGUCGUAUUGUU

20

SEQ. ID. NO. 2

UCAUGUGCCAGUGUUUGAAAAACGCGUUGAUUGCUGGUGUGGUGAGCUAGU

25

SEQ. ID. NO. 3

CUUCGAACGGCCUGGUUGUUGGUUUUAAUUCAUUUAUCCGCGUGGUCACGGU

30

SEQ. ID. NO. 4

UAGCUCACCACACCAGCAAUCAACGCGUUUUUCAAAACACUGGCACAUGA

SEQ. ID. NO. 5

35

AACAAUACGACUACACCAUCAAAAAGUAUUUAUCUUGCAUCGAAGGUUGGCA

SEQ. ID. NO. 6

GUGACCACGCGGAUAAAUGAAUCAAAAACAACAACCAGGGCCGUUCGACUACGC
UAAUUAUCCCG

40

SEQ. ID. NO. 7

U^FGC^FC^FAAC^FC^FU^FU^FC^FGAU^FGC^FAAGAU^FAAU^FAC^FU^FU^FU^FU^FGAU^FGGU^FGU^FAGU^FC^FGU^F
AU^FU^FGU^FU^F

45

SEQ. ID. NO. 8

U^FC^FAU^FGU^FGC^FC^FAGU^FGU^FU^FU^FGAAAAAC^FGC^FGU^FU^FGAU^FU^FGC^FU^FGGU^FGU^FGGU^F
GAGC^FU^FAGU^F

50

SEQ. ID. NO. 9

C^FU^FU^FC^FGAAC^FGGC^FC^FC^FU^FGGU^FU^FGU^FU^FGGU^FU^FU^FAAU^FU^FC^FAU^FU^FU^FAU^FC^FC^FG^F
C^FGU^FGGU^FC^FAC^FGGU^F

SEQ. ID. NO. 10

U^FAGC^FU^FC^FAC^FC^FAC^FAC^FC^FAGC^FAAU^FC^FAA^FGC^FGU^FU^FU^FU^FU^FC^FAAAC^FAC^FU^F
GGC^FAC^FAU^FGA

SEQ. ID. NO. 11

5 AAC^FAAU^FAC^FGAC^FU^FAC^FAC^FC^FAU^FC^FAAAAGU^FAU^FU^FAU^FC^FU^FU^FGC^FAU^FC^FGAAG
GU^FU^FGGC^FA

SEQ. ID. NO. 12

10 GU^FGAC^FC^FAC^FGC^FGGAU^FAAU^FGAAU^FC^FAAAAAC^FAA^FAC^FAA^FC^FAGGGC^FC^FGU^F
U^FC^FGAC^FU^FAC^FGC^FU^FAAU^FU^FAU^FC^FC^FC^FG

SEQ. ID. NO. 13

GACTGATTACGCCAGCTTGG

15 SEQ. ID. NO. 14

CACACTGGCGGCCGCTCGAG

SEQ. ID. NO. 15

20 AATTCGCCCTTGCCG

SEQ. ID. NO. 16

25 AGCTCGGATCCACTAATAA

SEQ. ID. NO. 17

30 GTTGTTGGTTTGGCTTGTT

SEQ. ID. NO. 18

AACACCAACACCAACA

35 SEQ. ID. NO. 19 (cebador)

5'-CGACTGCAGÄGCTTGCTACG(N)₅₀GGTACCGAGCTCGAATTCCC-3'

40 SEQ. ID. NO. 20 (cebador)

5'-GCGTAATACGACTCACTATAGGGAATTCGAGCTCGGTACC-3'

SEQ. ID. NO. 21 (cebador)

45 5'-CGACTGCAGAGCTTGCTACG-3'

SEQ. ID. NO. 22 (cebador)

5'-GCGTAATACGACTCACTATAG-3'

50 SEQ. ID. NO. 23

GACUGAUUACGCCAGCUUGG

SEQ. ID. NO. 24

GAC^FU^FGAU^FU^FAC^FGC^FC^FAGC^FU^FU^FGG

5

REIVINDICACIONES

1. Aptámero, o fragmento activo del mismo, que conserva la capacidad de alterar rosetas, obtenido contra la región semiconservada del dominio 1 α de tipo unión a Duffy, DBL1 α , de la proteína 1 de membrana de eritrocitos de *Plasmodium falciparum*, PfEMP1, en el que el aptámero se selecciona del grupo que consiste en

UAGCUCACCACACCAGCAAUCAACGCGUUUUUCAAACACUGGCACAU
GA (SEQ. ID. NO. 4)

AACAAUACGACUACACCAUCAAAAGUAUUAUCUUGCAUCGAAGGUUGG
CA (SEQ. ID. NO. 5),

y

GUGACCACGCGGAUAAAUGAAUCAAAAACAACAACCAGGGCCGUUCGA
CUACGCUAAUUAUCCCG (SEQ. ID. NO. 6)

o del grupo que consiste en aptámeros fluorados SEQ. ID. NO. 4 a 6, que consisten en

U^FAGC^FU^FC^FAC^FC^FAC^FC^FAC^FC^FAGC^FAAU^FC^FAAAC^FGC^FGU^FU^FU^FU^FU^FC^FAA
AC^FAC^FU^FGGC^FAC^FAU^FGA (SEQ. ID. NO. 10)

AAC^FAAU^FAC^FGAC^FU^FAC^FAC^FC^FAU^FC^FAAAAGU^FAU^FU^FAU^FC^FU^FU^FGC^FAU^F
C^FGAAGGU^FU^FGGC^FA (SEQ. ID. NO. 11)

GU^FGAC^FC^FAC^FGC^FGGAU^FAAU^FGAAU^FC^FAAAAC^FAAAC^FAAAC^FC^FAGGG
C^FC^FGU^FU^FC^FGAC^FU^FAC^FGC^FU^FAAU^FU^FAU^FC^FC^FC^FG (SEQ. ID. NO. 12).

2. Aptámero, o fragmento activo del mismo, que conserva la capacidad de alterar rosetas, obtenido contra la región semiconservada del dominio 1 α de tipo unión a Duffy, DBL1 α , de la proteína 1 de membrana de eritrocitos de *Plasmodium falciparum* (PfEMP1) para su uso en el tratamiento de la malaria cerebral, en el que el aptámero se selecciona del grupo que consiste en

UAGCUCACCACACCAGCAAUCAACGCGUUUUUCAAACACUGGCACAU
GA (SEQ. ID. NO. 4)

AACAAUACGACUACACCAUCAAAAGUAUUAUCUUGCAUCGAAGGUUGG
CA (SEQ. ID. NO. 5),

y

GUGACCACGCGGAUAAAUGAAUCAAAAACAACAACCAGGGCCGUUCGA
CUACGCUAAUUAUCCCG (SEQ. ID. NO. 6),

o del grupo que consiste en aptámeros fluorados que consisten en

U^FAGC^FU^FC^FAC^FC^FAC^FAC^FC^FAGC^FAAU^FC^FAAC^FGC^FGU^FU^FU^FU^FU^FC^FAA
AC^FAC^FU^FGGC^FAC^FAU^FGA (SEQ. ID. NO. 10)

AAU^FAAU^FAC^FGAC^FU^FAC^FAC^FC^FAU^FC^FAAAAGU^FAU^FU^FAU^FC^FU^FU^FGC^FAU^F
C^FGAAGGU^FU^FGGC^FA (SEQ. ID. NO. 11)

GU^FGAC^FC^FAC^FGC^FGGAU^FAAU^FGAAU^FC^FAAAAC^FAAC^FAAC^FC^FAGGG
C^FC^FGU^FU^FC^FGAC^FU^FAC^FGC^FU^FAAU^FU^FAU^FC^FC^FC^FG (SEQ. ID. NO. 12).

- 5
3. Método *in vitro* para diagnosticar la presencia de malaria grave, determinando la respuesta de una muestra de sangre a un aptámero obtenido contra la región semiconservada del dominio 1 α de tipo unión a Duffy, DBL1 α , de la proteína 1 de membrana de eritrocitos de *Plasmodium falciparum*, PfEMP1, en el que el aptámero se selecciona del grupo que consiste en
- 10

UAGCUCACCACACCAGCAAUCAACGCGUUUUUUUCAAACACUGGCACAU
GA (SEQ. ID. NO. 4)

AACAAUACGACUACACCAUCAAAAGUAUUUAUCUUGCAUCGAAGGUUGG
CA (SEQ. ID. NO. 5),

15

y

GUGACCACGCGGAUAAAUGAAUCAAAAACAACAACCAGGGCCGUUCGA
CUACGCUAAUUAUCCCG (SEQ. ID. NO. 6),

20

o del grupo que consiste en aptámeros fluorados que consisten en

U^FAGC^FU^FC^FAC^FC^FAC^FAC^FC^FAGC^FAAU^FC^FAAC^FGC^FGU^FU^FU^FU^FU^FC^FAA
AC^FAC^FU^FGGC^FAC^FAU^FGA (SEQ. ID. NO. 10)

AAU^FAAU^FAC^FGAC^FU^FAC^FAC^FC^FAU^FC^FAAAAGU^FAU^FU^FAU^FC^FU^FU^FGC^FAU^F
C^FGAAGGU^FU^FGGC^FA (SEQ. ID. NO. 11)

25

GU^FGAC^FC^FAC^FGC^FGGAU^FAAU^FGAAU^FC^FAAAAC^FAAC^FAAC^FC^FAGGG
C^FC^FGU^FU^FC^FGAC^FU^FAC^FGC^FU^FAAU^FU^FAU^FC^FC^FC^FG (SEQ. ID. NO. 12).

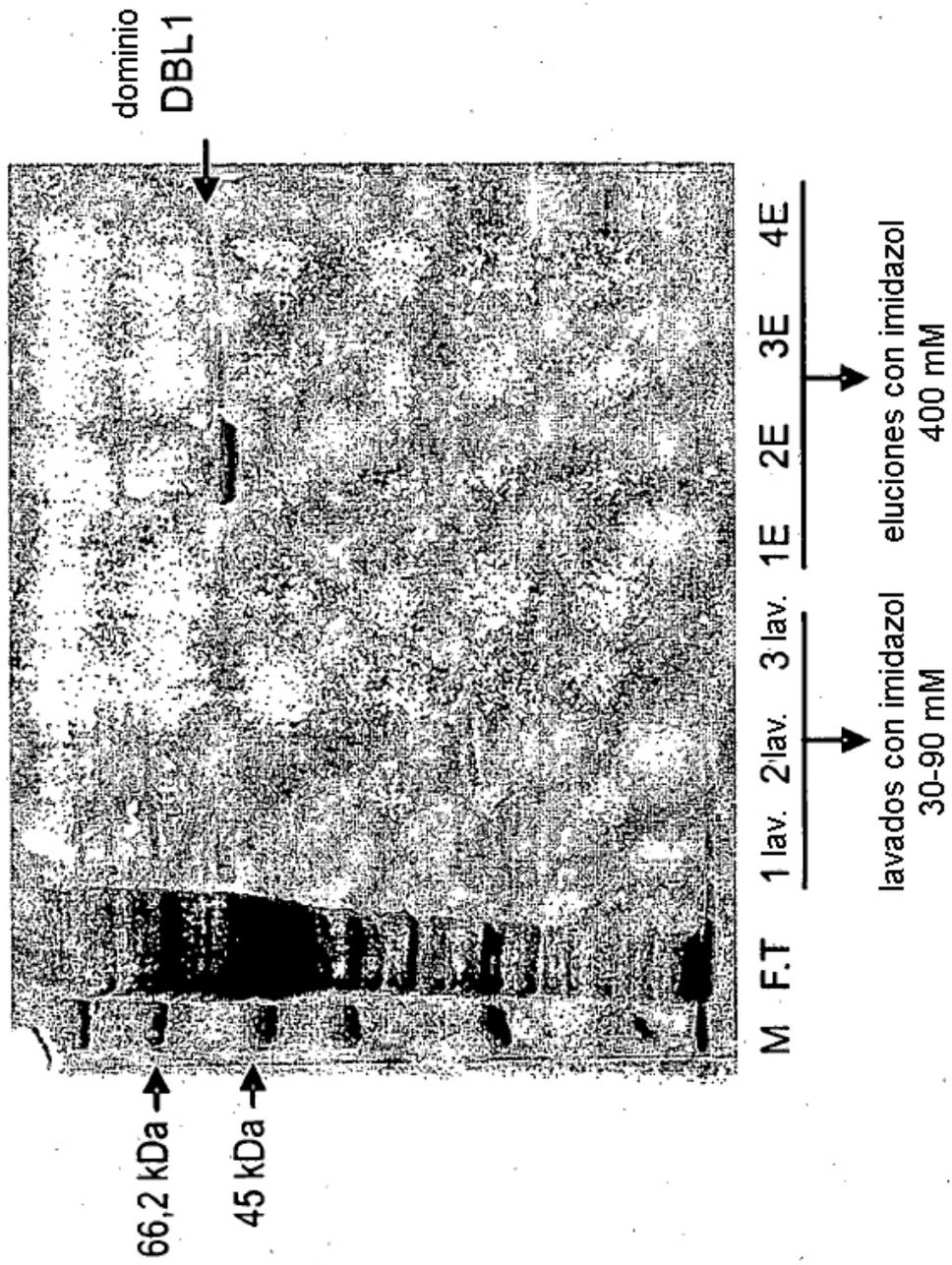


Figura 1

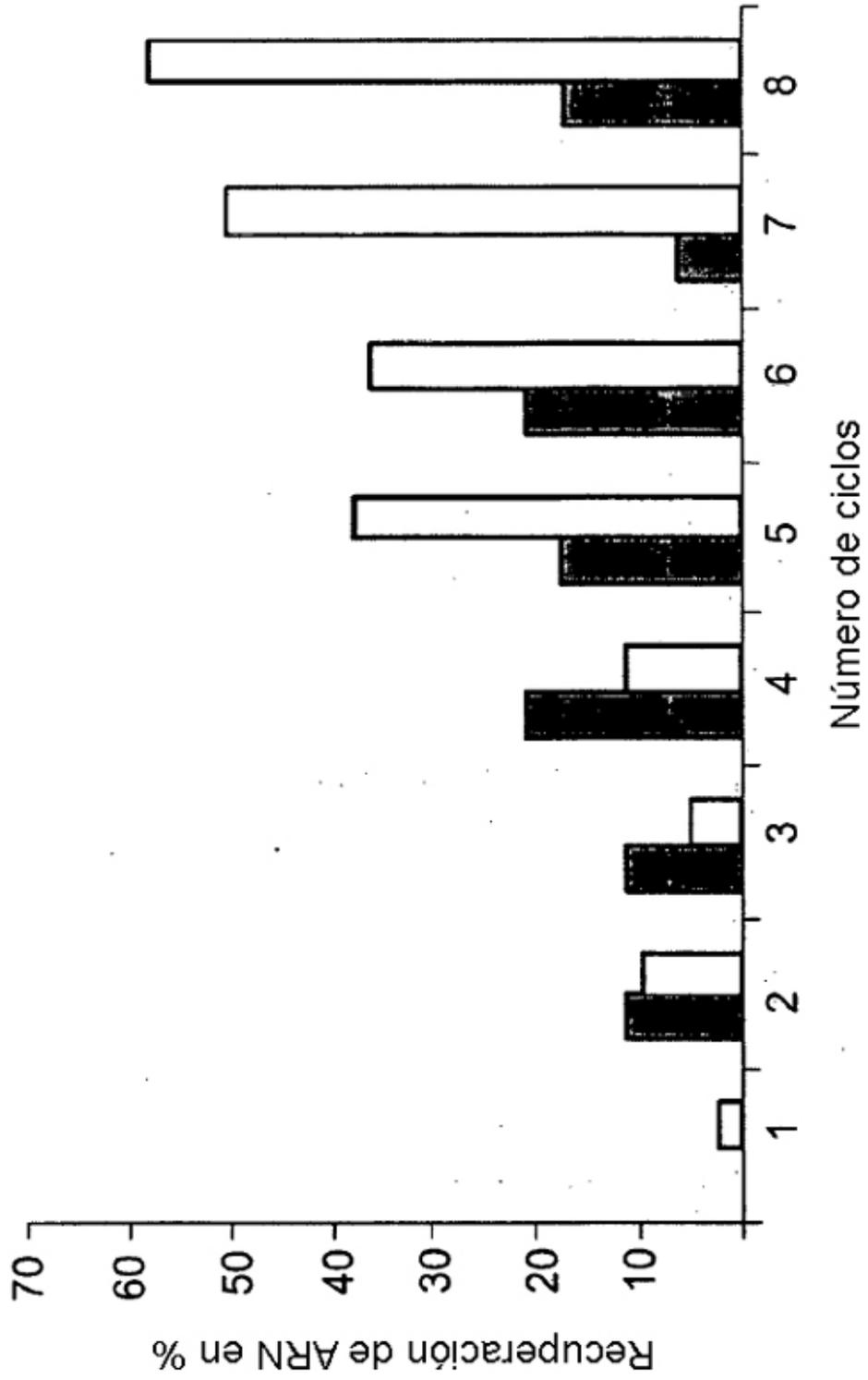


Figura 2

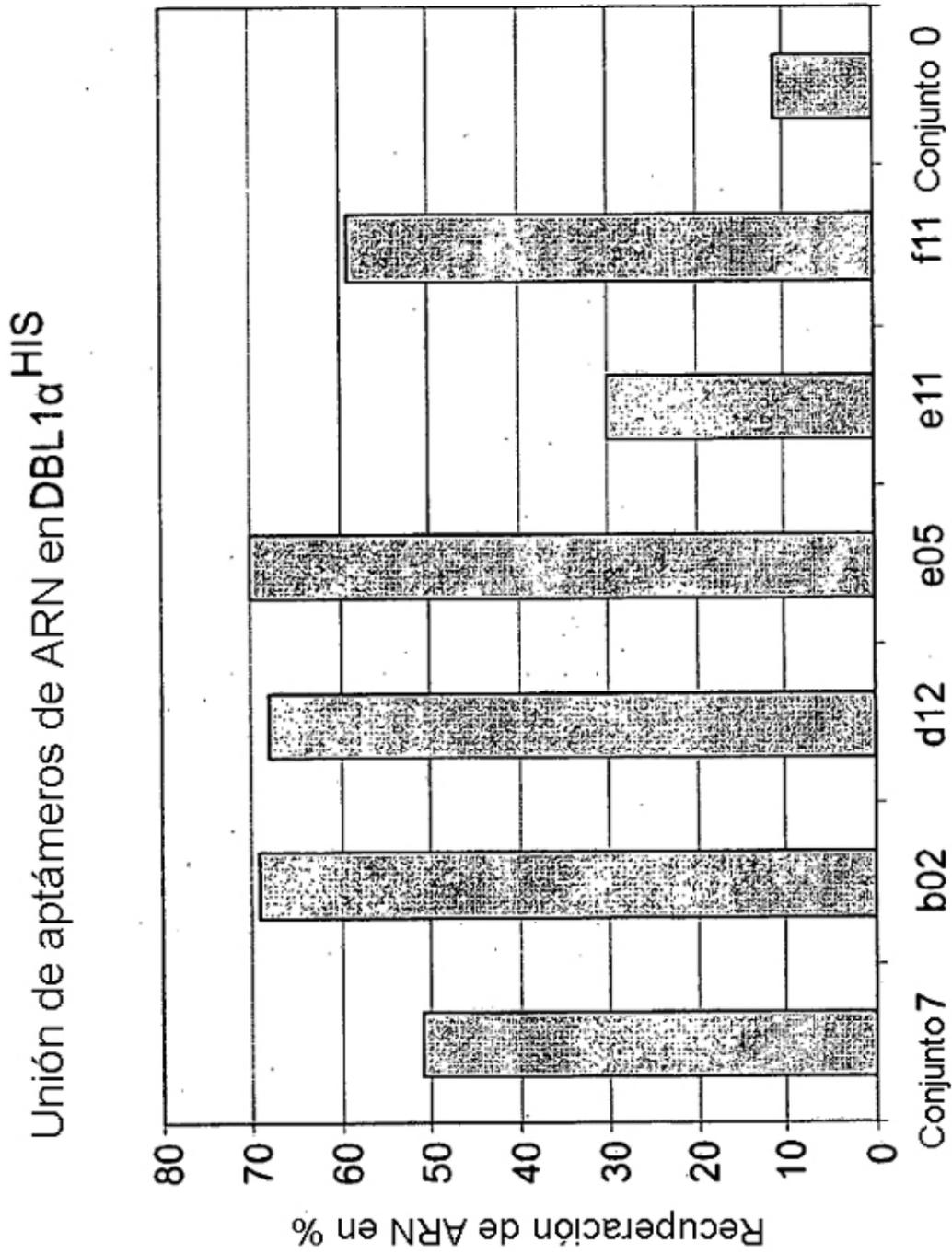


Figura 3

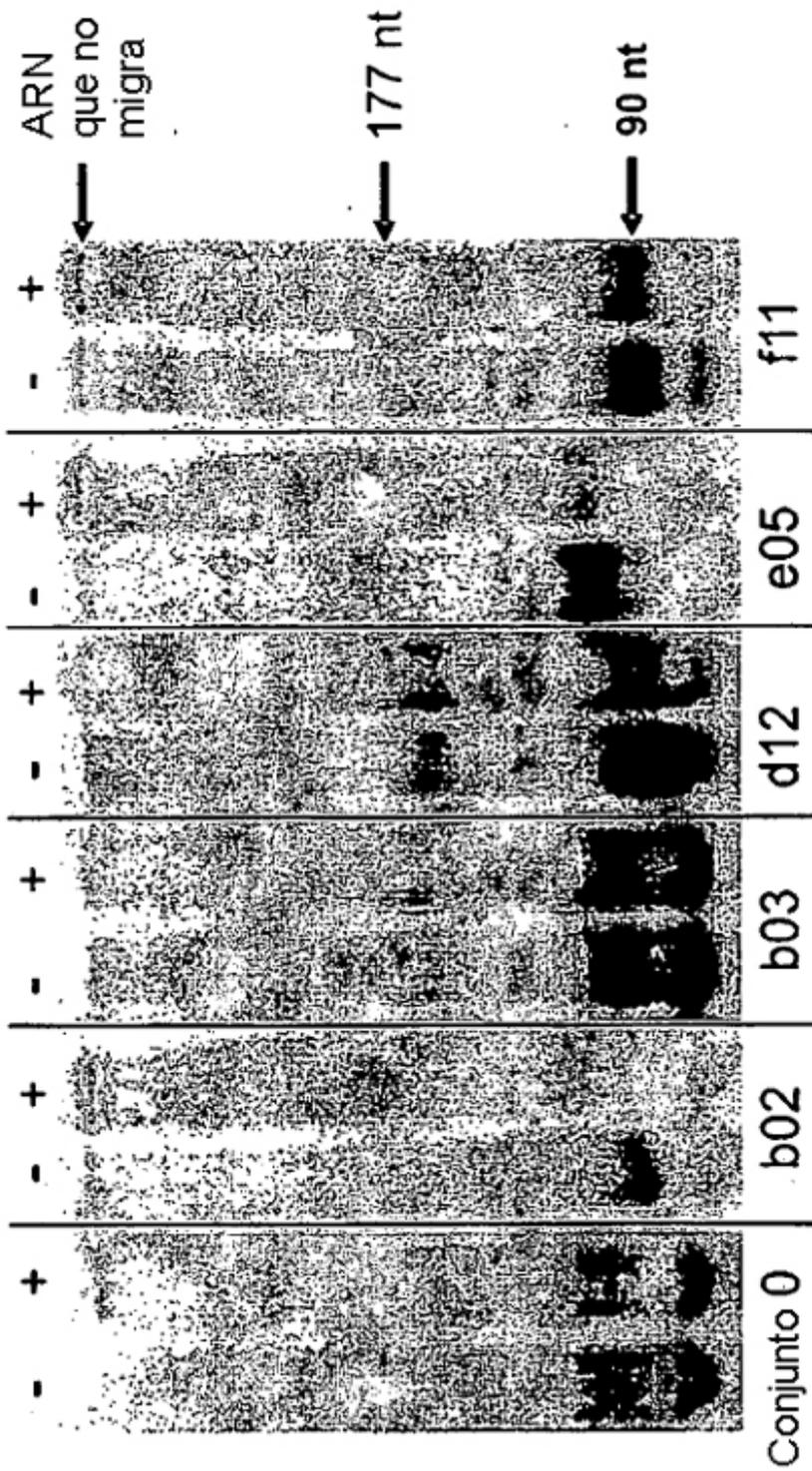


Figura 4

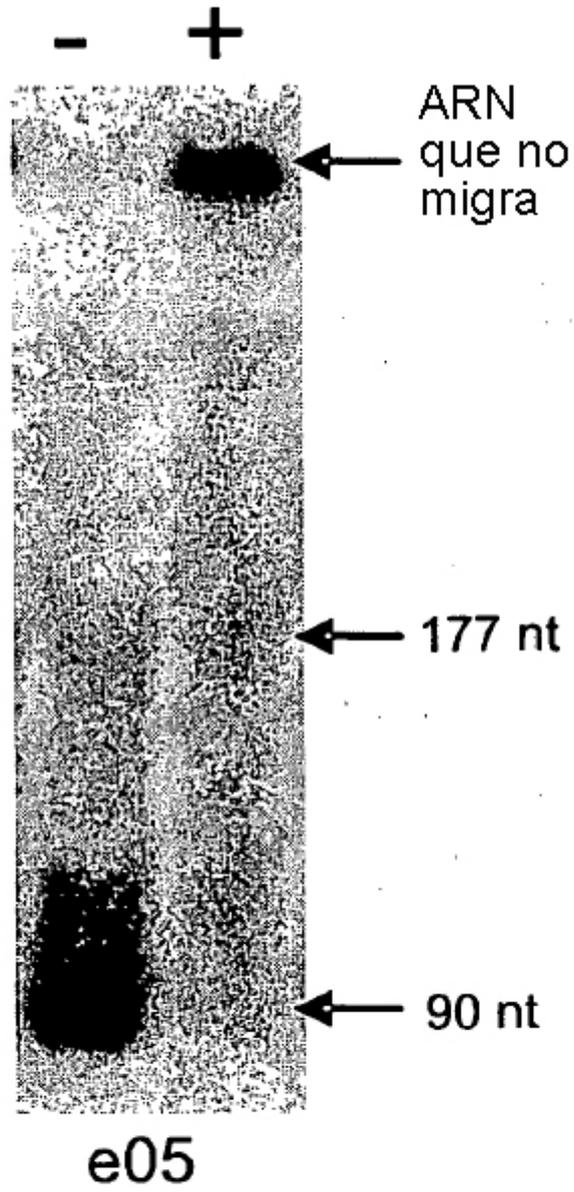


Figura 5

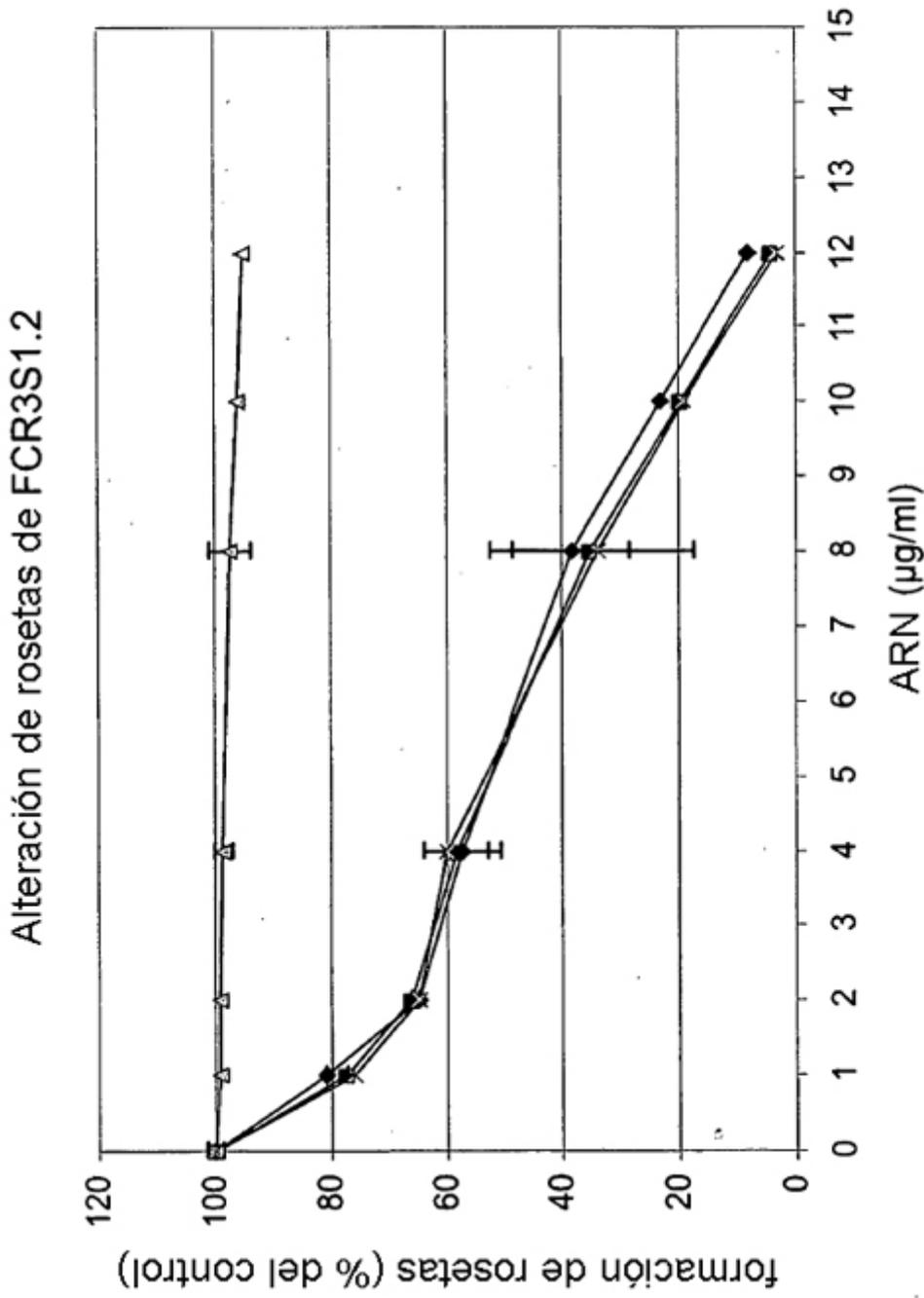


Figura 6

Alteración de rosetas de FCR3S1.2

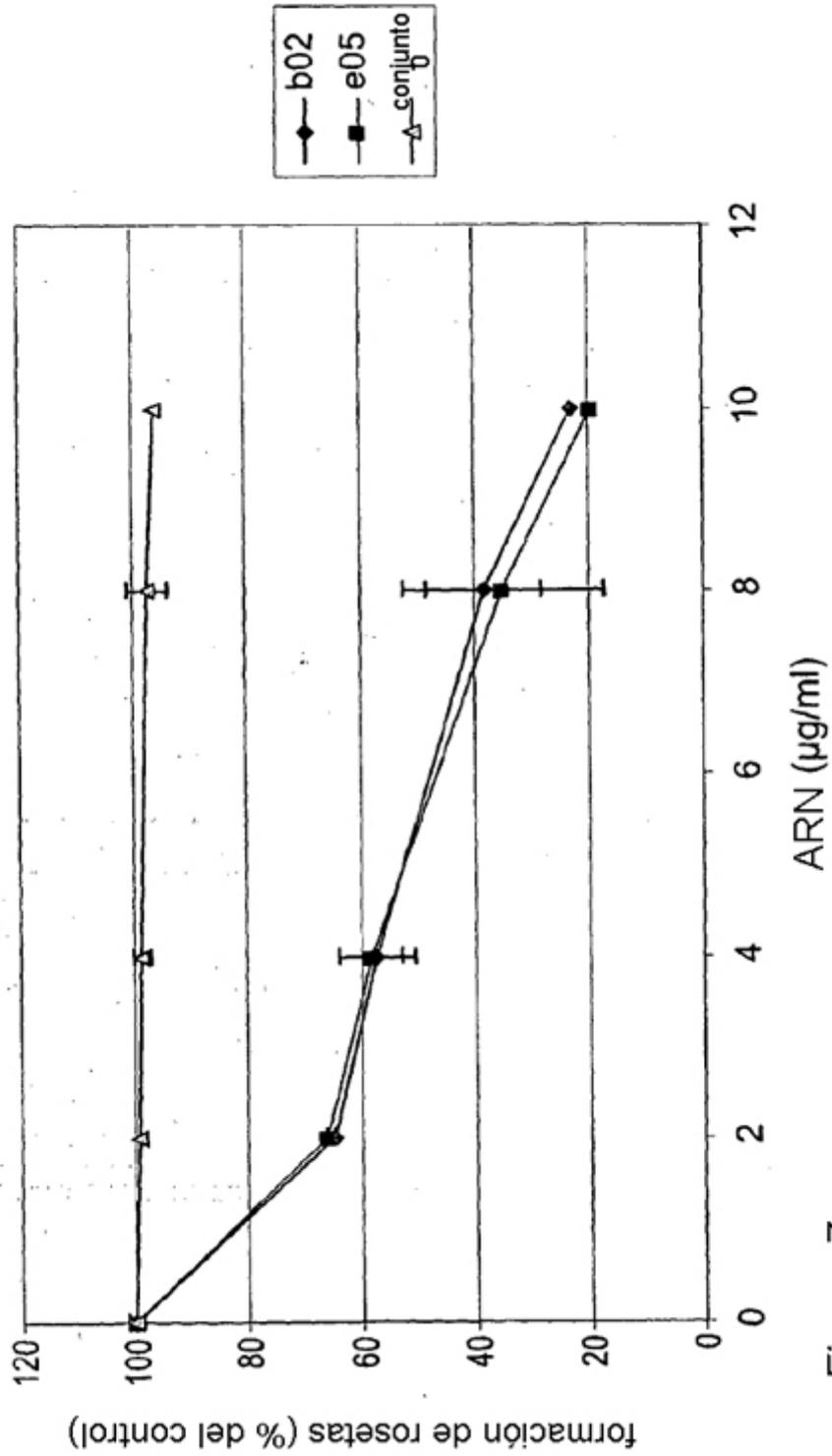


Figura 7

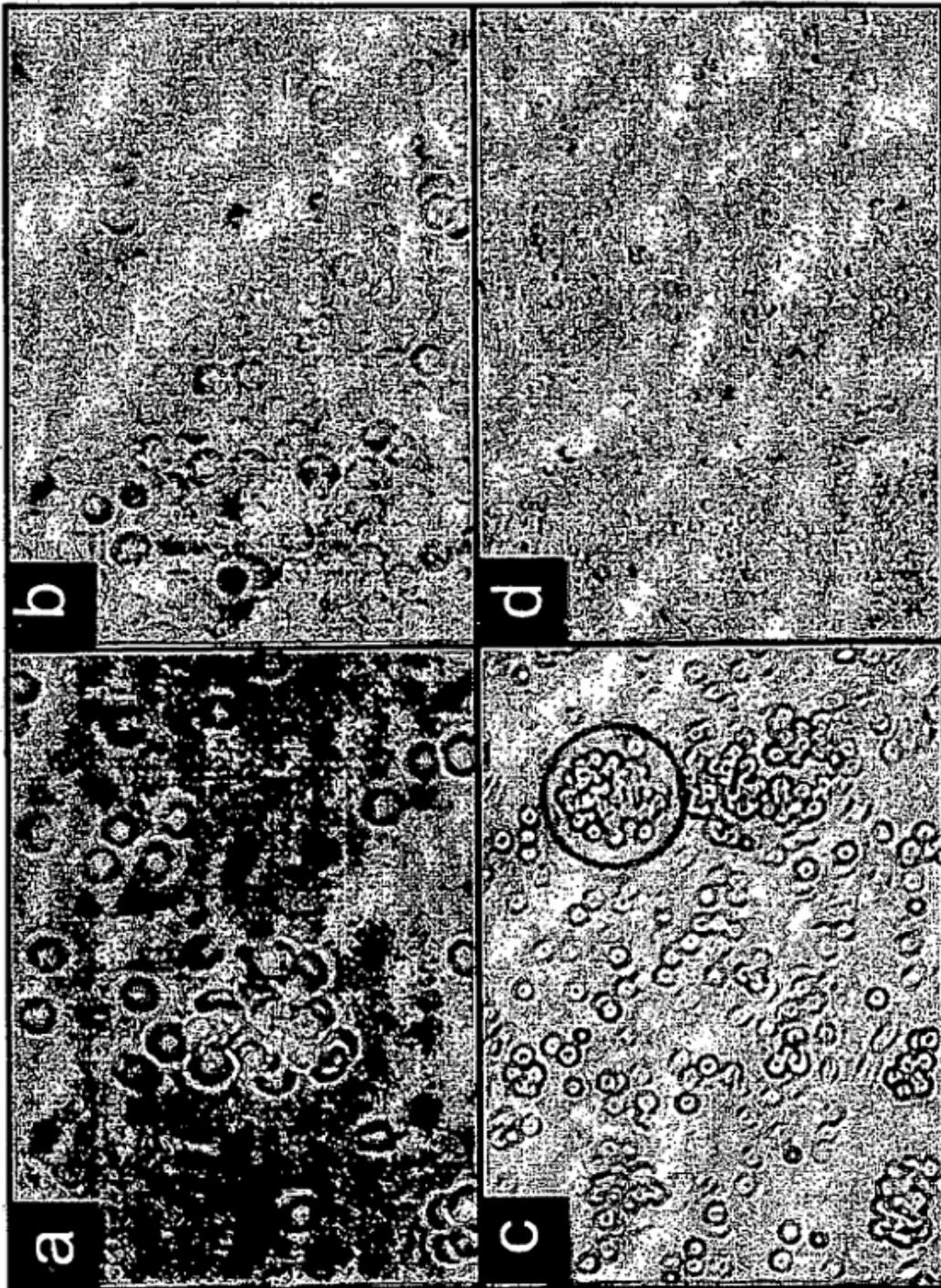


Figura 8