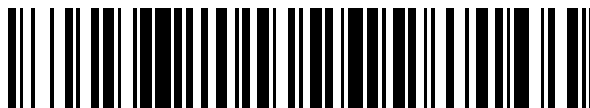


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 555 160**

21 Número de solicitud: 201430955

51 Int. Cl.:

C12N 15/115 (2010.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

24.06.2014

43 Fecha de publicación de la solicitud:

29.12.2015

71 Solicitantes:

**APTUS BIOTECH, S.L. (100.0%)
Faraday 7, Campus de Cantoblanco
28049 Madrid ES**

72 Inventor/es:

**LIZASOAIN HERNÁNDEZ, Ignacio;
GONZÁLEZ MUÑOZ, Víctor Manuel;
FERNÁNDEZ GÓMEZ-CHACÓN, Gerónimo;
MORO SÁNCHEZ, María Ángeles;
MARTÍN PALMA, María Elena y
MORAGA YÉBENES, Ana**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

54 Título: **Aptámeros específicos de TLR-4 y usos de los mismos**

57 Resumen:

Aptámeros específicos de TLR-4 y usos de los mismos.

La invención se refiere a un aptámero de ácido nucleico con capacidad de unirse específicamente e inhibir a TLR-4, a un complejo que comprende dicho aptámero y un grupo funcional, así como a composiciones farmacéuticas de los mismos. La invención también se refiere a usos y métodos para detectar TLR-4 y a usos y métodos para inhibir TLR-4. Por último, la invención también se refiere a un aptámero para su uso en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una patología caracterizada por un aumento de expresión de TLR4 y/o un aumento de activación de TLR-4.

ES 2 555 160 A1

DESCRIPCIÓN**APTÁMEROS ESPECÍFICOS DE TLR-4 Y USOS DE LOS MISMOS****5 CAMPO DE LA INVENCION**

La presente invención proporciona aptámeros de ácido nucleico con capacidad de unirse específicamente e inhibir a TLR-4 y usos de los mismos.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Actualmente, se conoce que el Sistema Nervioso Central (SNC) responde, tanto ante las infecciones bacterianas como ante un daño cerebral, con una reacción inmune innata muy bien organizada. El sistema inmune innato tiene la capacidad de reconocer patrones moleculares altamente conservados, a través, entre otros, de receptores de membrana de la familia “*toll-like*” (en inglés *Toll-like receptors*: TLR).

El TLR4 fue el primer TLR caracterizado en mamíferos. Se han descrito ligandos exógenos para este TLR, como el lipopolisacárido (LPS) de bacterias gram-negativas, el ácido lipoteicoico (en inglés, *lipoteichoic acid*, LTA) de bacterias gram-positivas o la proteína F del virus respiratorio sincitial. Además, los ligandos endógenos más importantes son la HMBG1, la HSP-60, de origen endógeno o derivada de *Chlamydia pneumoniae*, HPS-70, fibronectina, fibrinógeno, ácido hialurónico, etc., todas derivadas del daño tisular, celular y/o de los vasos del huésped. El TLR4 está implicado en gran cantidad de patologías de alta prevalencia, como ictus o enfermedad cerebrovascular, infarto agudo de miocardio, sepsis, aterosclerosis, esclerosis múltiple y artritis reumatoide entre otras.

La implicación de la inmunidad innata y, en particular, de los TLRs en múltiples patologías, ha supuesto un interés creciente por el desarrollo de agonistas y antagonistas de estos receptores. Así, se han desarrollado agonistas para el posible tratamiento del cáncer, de enfermedades alérgicas, de infecciones y como coadyuvantes de vacunas. Por otra parte, antagonistas de TLRs se están estudiando en sepsis, en aterosclerosis, en dolor crónico y en colitis; de hecho existen varios antagonistas, eritoran (fase III), ibudilast (Av411; fase II), anticuerpos NI-0101 (fase preclínica) que se están estudiando en estas patologías.

35

En el documento de patente WO 2006/138681 se describe un método para inhibir la deleción intrahepática de células T activadas mediante la administración de un inhibidor de TLR-4, entre los que se mencionan los aptámeros específicos para TLR-4.

5 Roger y colaboradores (Roger *et al.*, 2009, Proc Natl Acad Sci USA 106:2348-52) describen anticuerpos específicos para el dominio extracelular de TLR4. Estos anticuerpos confieren protección contra la sepsis letal de bacterias Gram negativas en ratones. También se sugiere la utilidad terapéutica de estos anticuerpos anti-TLR-4, dado que el tratamiento es efectivo cuando los anticuerpos son administrados hasta 4 h después de la exposición a
10 endotoxina y hasta 13 h después de la aparición de la infección por *Escherichia coli*.

Por lo tanto, existe una necesidad en la técnica de nuevas moléculas con capacidad de unirse específicamente e inhibir a TLR-4 y que sean útiles como agentes terapéuticos.

15 **BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN**

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un aptámero de ácido nucleico con capacidad de unirse específicamente e inhibir a TLR-4, y que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 o una variante
20 funcionalmente equivalente de las mismas.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un complejo que comprende el aptámero de la invención y un grupo funcional

25 En otro aspecto, la presente invención se refiere al uso del aptámero de la invención o del complejo de la invención para detectar TLR-4.

En otro aspecto, la presente invención se refiere al uso *in vitro* del aptámero de la invención o del complejo de la invención para inhibir TLR-4.

30 En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método *in vitro* para la detección de TLR-4 en una muestra que comprende

- i) poner en contacto dicha muestra con un aptámero según la invención, o un complejo según la invención,
- 35 ii) separar el aptámero o complejo no unido a TLR-4, y

- iii) detectar la presencia del aptámero o complejo unido al TLR-4 presente en la muestra.

Método *in vitro* para inhibir TLR-4 en una muestra que comprende poner en contacto una muestra que comprende TLR-4 con un aptámero según la invención, o un complejo según la invención, en condiciones adecuadas inhibir TLR-4.

Un aptámero de la invención para su uso en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una patología caracterizada por un aumento de expresión de TLR4 y/o un aumento de activación de TLR-4.

Una composición farmacéutica que comprende al menos un aptámero según la invención o al menos un complejo según la invención, opcionalmente en combinación con uno o más soportes, excipientes o solventes farmacéuticamente aceptables.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Reconocimiento de la proteína TLR-4 por los aptámeros seleccionados mediante ELONA. La proteína TLR-4 humana recombinante (6xHIS-TLR-4) fue plaqueada a una concentración de 100 ng/pocillo en placas de microtitulación de 96 pocillos e incubada a 4°C durante 16 h. Posteriormente, 20 pmoles de cada uno de los aptámeros marcados con digoxigenina fueron añadidos a cada pocillo y la placa fue incubada durante 1 h a 37°C. Por último, la placa fue incubada con anticuerpos anti-digoxigenina conjugados con peroxidasa y revelada usando ABTS. Como control positivo se utilizó un aptámero de ADN frente a Li H2A (Martín et al., 2013, PLoS ONE 8: e78886). Todos los experimentos fueron realizados por triplicado.

Figura 2. Estructuras secundarias de los aptámeros TLRApt#1R (SEQ ID NO: 3), y TLRApt#4F (SEQ ID NO: 4) predichas utilizando el programa mFold. En los recuadros aparecen las guaninas que podrían formar parte de estructuras G-cuadruplex predichas con el programa QGRS Mapper.

Figura 3. Unión de los aptámeros TLRApt#1R (SEQ ID NO: 3), y TLRApt#4F (SEQ ID NO: 4) a hTLR-4 recombinante (A) y a la proteína TLR-4 expresada en células (B). Todos los experimentos fueron hechos por triplicado.

Figura 4. Actividad antagonista de los aptámeros TLRApt#1R (SEQ ID NO: 3), y TLRApt#4F (SEQ ID NO: 4) sobre células HEK-Blue hTLR4.. y el antagonista LPS-RS-UP (2 ng/μl; 20 ng) como controles, y Se aplicaron los aptámeros a una concentración de 20 nM (A) o a concentraciones finales de 0.2, 2, 20 y 200 nM (B) o el antagonista control LPS-RS-UP (2 ng/μl; 20 ng). Como control, se utilizó el agonista LPS-EK-UP (0.02 ng/μl). Todos los experimentos fueron hechos por triplicado. Significancia estadística (*P<0.05, **P<0.01 y ***P<0.001).

Figura 5. Estructuras secundarias de los aptámeros TLRApt#1R-T (SEQ ID NO: 1), y TLRApt#4F-T (SEQ ID NO: 2) predichas utilizando el programa mFold. En los recuadros aparecen las guaninas que podrían formar parte de estructuras G-cuadruplex predichas con el programa QGRS Mapper.

Figura 6. Efecto de la inyección intraperitoneal de los aptámeros TLRApt#1R y TLRApt#4F en la reducción de la zona infartada en animales de experimentación. Ratones machos adultos C57BL/10ScSn (WT; normal) y C57BL/10ScNJ (KO, carente de TLR4 funcional), fueron sometidos a inducción de una isquemia focal cerebral mediante oclusión de la arteria cerebral media con ligadura. Los ratones fueron anestesiados con isoflurano y 24 horas después de MCAO, el tamaño del infarto se ha evaluado por MRI. Las imágenes resaltadas en T2 (T2WI) han sido adquiridas en un BIOSPEC BMT 47/40 operando a 4.7 T (Bruker-Medical, Ettlingen, Alemania; MRI Unit, Instituto Pluridisciplinar, UCM) y el área dañada es cuantificada mediante Image J 1.41 (NIH, Bethesda, Washington). Significancia estadística (*P<0.05).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Los autores de la presente invención han seleccionado y caracterizado dos moléculas que, debido a sus secuencias, son capaces de estructurarse tridimensionalmente en unas determinadas condiciones de pH, temperatura y concentraciones salinas, lo que les confiere la capacidad de reconocer de forma específica a la proteína TLR-4 y modular su actividad. Estas moléculas pueden inhibir la respuesta celular mediada por el receptor TLR-4 *in vivo* y son capaces de reducir el tamaño del infarto en animales de experimentación, lo que les confiere un potencial papel terapéutico.

Aptámero específico de TLR-4

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un aptámero de ácido nucleico con capacidad de unirse específicamente e inhibir a TLR-4, en lo sucesivo denominado el “aptámero de la invención”, y que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1 (CCGGCACGGGACAAGGCGCGGGACGGCGTAGATCAGGTC
 5 GACACC) y SEQ ID NO: 2 (GGTGTGCCAATAAACCATATCGCCGCGTTAGCATGTACTCG GTTGGCCCTAAATACGAG) o una variante funcionalmente equivalente de las mismas.

El término “aptámero”, en el contexto de la presente invención, se refiere a cadenas de ácido nucleico monocatenarios que adoptan una estructura terciaria específica que les
 10 permite unirse a dianas moleculares con alta especificidad y afinidad, comparable a la de los anticuerpos monoclonales, a través de interacciones distintas a las de emparejamiento de bases de Watson-Crick clásicas.

El término “ácido nucleico”, en el contexto de la presente invención, se refiere a cualquier
 15 tipo de ácido nucleico, como ADN y ARN, y a variantes de los mismos, tales como el ácido peptidonucleico (APN, o en inglés “*peptide nucleic acid*” o PNA), el ácido nucleico bloqueado (ANB, o en inglés “*locked nucleic acid*” o LNA), así como combinaciones de los mismos, modificaciones de los mismos, que incluyen nucleótidos modificados, etc. Los términos “ácido nucleico” y “oligonucleótido” y “polinucleótido” se emplean indistintamente en el
 20 contexto de la presente invención. Los ácidos nucleicos pueden purificarse a partir de fuentes naturales, producirse usando sistemas de expresión recombinantes y, opcionalmente, purificados, sintetizados químicamente, etc. Cuando sea apropiado, por ejemplo, en el caso de moléculas sintetizadas químicamente, los ácidos nucleicos pueden comprender análogos de nucleósidos tales como análogos que tienen bases modificadas
 25 químicamente o azúcares, modificaciones del esqueleto, etc. Una secuencia de ácido nucleico se representa en la dirección 5'-3' a menos que se indique lo contrario.

El término “TLR-4”, en el contexto de la presente invención, se refiere al receptor de membrana de la familia “*toll-like*” 4. El receptor TLR-4 también puede denominarse como
 30 ARMD10, CD284, TLR4 o hTOLL. En humanos, el receptor TLR-4 está recogido bajo el número de acceso en GenBank O00206.2 a 27 de mayo de 2014, y que está codificado por el gen *TLR4*. Está formado por 839 aminoácidos, de los cuales los residuos 1-23 constituyen la secuencia señal, los residuos 24-631 constituyen el dominio extracelular, los residuos 632-652 constituyen el dominio transmembrana y los residuos 653-839 constituyen el
 35 dominio citoplásmico.

En una realización particular, el aptámero tiene capacidad de unirse específicamente al dominio extracelular de TLR-4 (aminoácidos 24-631).

La presente invención contempla un aptámero que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1 (CCGGCACGGGACAAGGCGCGGGACGGCGTA GATCAGGTCGACACC) y SEQ ID NO: 2 (GGTGTGCCAATAAACCATATCGCCGCGTTAGC ATGTACTCGGTTGGCCCTAAATACGAG) o una variante funcionalmente equivalente de las mismas.

La presente invención también contempla aptámeros de la invención que estén compuestos por ácidos nucleicos como ADN y ARN, así como por variantes y análogos de ácidos nucleicos y combinaciones de los mismos, modificaciones de los mismos, que incluyen, sin limitación, esqueletos de ácido nucleico modificado, enlaces de sustitución, nucleótidos modificados, y análogos de ribosa o desoxirribosa, nucleótidos modificados, etc. con una capacidad de unirse específicamente e inhibir a TLR-4 de al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 91%, al menos el 92%, al menos el 93%, al menos el 94%, al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98%, al menos el 99%, o al menos el 100% de la capacidad de unirse específicamente e inhibir a TLR-4 del aptámero de secuencia SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2. Ejemplos no limitativos de variantes y análogos de ácidos nucleicos incluyen, sin limitación, APN, ANB y ATN.

El término "variante de un ácido nucleico" o "análogo de un ácido nucleico", en el contexto de la presente invención, se refiere a variantes y análogos de ácidos nucleicos que incluyen, sin limitación, esqueletos de ácido nucleico modificado, enlaces de sustitución, nucleótidos modificados, y análogos de ribosa o desoxirribosa. Por ejemplo, variantes de ácidos nucleicos según la presente invención pueden comprender estructuras con esqueletos sintéticos análogos del esqueleto típico fosfodiéster. Estos incluyen, sin limitación, fosforotioato, fosforoditioato, metilfosfonato, fosforamidato, fosfotriéster de alquilo, sulfamato, 3'-tioacetal, metileno(metilimino), 3'-N-carbamato, carbamato de morfolino y ácidos nucleicos peptídicos (PNA), enlaces metilfosfonato o alternando metilfosfonato y fosfodiéster y bencilfosfonato.

Las variantes de un ácido nucleico también pueden contener uno o más enlaces "de sustitución", como se entiende generalmente en la técnica. Algunos de estos enlaces de sustitución son apolares y contribuyen a la proporcionar al aptámero de una capacidad de

difundirse a través de las membranas. Estos enlaces "de sustitución" se definen aquí como enlaces alternativos convencionales tales como fosfortioato o fosforamidato, y se sintetizan como se describe en la literatura comúnmente disponible. Grupos de unión alternativos incluyen, de manera no limitativa, realizaciones en las que un resto de fórmula P(O)S, ("tioato") , P(S)S ("ditioato"), P(O)NR'₂, P(O)R', P(O)OR⁶, CO, o CONR'₂, en donde R' es H (o una sal) o un grupo alquilo de 1-12 átomos de C y R⁶ es un grupo alquilo de 1-9 átomos de C, que se unen a los nucleótidos adyacentes a través de -S- o de -O-. Enlaces ditioato se describen en la solicitud US 248517. La presente invención también contempla el uso de enlaces de sustitución que incluyen enlaces internucleotídicos no basados en fósforo tales como 3'-tioformacetal, (-S-CH₂-O-), formacetal (-O-CH₂-O-) y enlaces internucleotídicos 3'-amina (-NH-CH₂-CH₂-) descritos en las solicitudes US 690786 y US 763130. Se pueden utilizar uno o más enlaces de sustitución en los aptámeros de la invención con el fin de facilitar aún más la unión a TLR-4 o para aumentar la estabilidad de los aptámeros frente a nucleasas, así como para conferir capacidad de permeación. No todos los enlaces dentro del mismo aptámero tienen que ser idénticos y, por tanto, la presente invención contempla aptámeros con todos los enlaces idénticos así como aptámeros con una variación en la composición de sus enlaces.

Asimismo, las variantes ácidos nucleicos según la presente invención también pueden contener formas análogas de ribosa o desoxirribosa que son bien conocidas en la técnica, incluyendo sin limitación azúcares sustituidos en 2' tales como 2'-O-metil-ribosa, 2'-fluoro-ribosa o 2'-azido-ribosa, análogos carbocíclicos de azúcares, azúcares α -anoméricos, azúcares epiméricos tales como arabinosa, xilosas o lixoses, azúcares de piranosa, azúcares de furanosa y sedoheptulosas. Los ácidos nucleicos también pueden contener ácido nucleico de treosa (ANT, o en inglés "*threose nucleic acid*" o TNA, también referido como oligonucleótidos alfa-treofuranosilos) (Véase, por ejemplo, Schong et al., Science 2000 17 de noviembre de 290 (5495): 1347-1351). En particular, la sustitución en la posición 2' del residuo de furanosa es particularmente importante con respecto a la mejora de la estabilidad nucleasa.

El término "nucleótido", en el contexto de la presente invención, se refiere a los monómeros que conforman los ácidos nucleicos. Los nucleótidos están formados por una pentosa, una base nitrogenada y un grupo fosfato, y están unidos mediante enlaces fosfodiéster. Los nucleótidos que forman parte de ADN y ARN se diferencian en la pentosa, siendo ésta desoxirribosa y ribosa respectivamente. Las bases nitrogenadas, a su vez, se dividen en bases nitrogenadas purínicas, que son la adenina (A) y la guanina (G), y en bases

nitrogenadas pirimidínicas, que son la timina (T), la citosina (C) y el uracilo (U). La timina únicamente aparece en el ADN, mientras que el uracilo únicamente en el ARN. La presente invención contempla el uso de nucleótidos modificados en el aptámero de la invención. El término “nucleótido modificado”, en el contexto de la presente invención, se refiere a

5 análogos conocidos de nucleótidos naturales, con propiedades de unión similares o mejoradas. Formas análogas de purinas y pirimidinas son bien conocidas en la técnica, e incluyen, sin limitación, aziridinilcitosina, 4-acetilcitosina, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-carboximetilaminometil-2-tiouracilo, 5-carboximetilaminometiluracilo, inosina, N₆-isopenteniladenina, 1-metiladenina, 1-metilpseudouracilo, 1-metilguanina, 1-metilinosina,

10 2,2-dimetilguanina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, N₆-metiladenina, 7-metilguanina, 5-metilaminometiluracilo, 5-metoxiaminometil-2-tiouracilo, beta-D-manosilqueosina, 5-metoxiuracilo, 2-metiltio-N-6-isopenteniladenina, éster metílico de ácido uracilo-5-oxiacético, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo, ácido uracilo-5-oxiacético, y 2,6-diaminopurina.

15 Además de los nucleótidos modificados anteriores, residuos de nucleótidos que carezcan de una purina o una pirimidina también se pueden incluir en la presente invención.

Además de las variantes anteriores, las variantes de ácido nucleico comprendidas en la invención también incluyen APN, ANB y cadenas 5'-5' o 3'-3'. El término “ácido

20 peptidonucleico” o “APN” o “PNA”, en el contexto de la presente invención, se refiere a un oligonucleótido cuyo esqueleto se compone de unidades repetitivas de N-(2-aminoetil)-glicina unidas por enlaces peptídicos, en donde las diferentes bases nitrogenadas están unidas a la cadena principal por un enlace de metileno (-CH₂-) y un grupo carbonilo (-(C=O)-). El término “ácido nucleico bloqueado” o “ANB” o “LNA”, en el contexto de la presente

25 invención, se refiere a un nucleótido modificado de ARN cuyo resto de ribosa está modificado con un enlace adicional que conecta el oxígeno en 2' con el carbono en 4', bloqueando la ribosa en la conformación 3'-endo. El término “cadena 5'-5'” o “cadena 3'-3'”, en el contexto de la presente invención, se refiere a oligonucleótidos en los cuales el nucleótido del extremos 3' o 5', respectivamente, está invertido.

30 Tal como se utiliza en la presente invención, el término “variante funcionalmente equivalente” se refiere a aptámeros con secuencias sustancialmente similares a SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 que mantienen su capacidad de unirse específicamente e inhibir a TLR-4. Una variante funcionalmente equivalente del aptámero de la invención puede ser una

35 secuencia de ácido nucleico derivado de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 que comprende la adición, sustitución o modificación de uno o más nucleótidos. A modo de ilustración,

variantes funcionalmente equivalentes del aptámero de la invención incluyen secuencias que comprenden la adición de 1 nucleótido, 2 nucleótidos, 3 nucleótidos, 4 nucleótidos, 5 nucleótidos, 10 nucleótidos, 15 nucleótidos, 20 nucleótidos, 25 nucleótidos, 30 nucleótidos, 35 nucleótidos, 40 nucleótidos, 45 nucleótidos, 50 nucleótidos, 60 nucleótidos, 70 nucleótidos, 80 nucleótidos, 90 nucleótidos, 100 nucleótidos, 150 nucleótidos, 200 nucleótidos, al menos 500 nucleótidos, al menos 1000 nucleótidos o más en el extremo 5' de la secuencia SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO: 2 y/o que comprenden la adición de 1 nucleótido, 2 nucleótidos, 3 nucleótidos, 4 nucleótidos, 5 nucleótidos, 10 nucleótidos, 15 nucleótidos, 20 nucleótidos, 25 nucleótidos, 30 nucleótidos, 35 nucleótidos, 40 nucleótidos, 45 nucleótidos, 50 nucleótidos, 60 nucleótidos, 70 nucleótidos, 80 nucleótidos, 90 nucleótidos, 100 nucleótidos, 150 nucleótidos, 200 nucleótidos, al menos 500 nucleótidos, al menos 1000 nucleótidos o más en el extremo 3' de la secuencia SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO: 2, y que mantienen una capacidad de unirse específicamente e inhibir a TLR-4 de al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 91%, al menos el 92%, al menos el 93%, al menos el 94%, al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98%, al menos el 99%, o al menos el 100% de su capacidad de unirse específicamente e inhibir a TLR-4.

La presente invención también incluye aptámeros que comprenden secuencias de nucleótidos con una identidad de secuencia de al menos el 70%, al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 91%, al menos el 92%, al menos el 93%, al menos el 94%, al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98%, o al menos el 99% con las secuencias SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO: 2 y que mantienen una capacidad de unirse específicamente e inhibir a TLR-4 de al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 91%, al menos el 92%, al menos el 93%, al menos el 94%, al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98%, al menos el 99%, o al menos el 100% de su capacidad de unirse específicamente e inhibir a TLR-4.

El término "identidad", en el contexto de la presente invención, se refiere a la relación de similitud global entre moléculas de ácido nucleico, la cual se expresa en forma de un porcentaje de identidad. El cálculo del porcentaje de identidad de dos secuencias de ácidos nucleicos se puede realizar mediante la alineación de las dos secuencias para propósitos de comparación óptima, y es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias, teniendo en cuenta el número de huecos y la longitud de cada hueco, que debe ser introducida para la alineación óptima de las dos secuencias. La comparación de

secuencias y la determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias se puede llevar a cabo utilizando un algoritmo matemático como el incorporado en el programa LALIGN (Goujon et al., 2010, Nucleic Acids Res 38(Web Server issue):W695-9).

5 El término “unión específica” o “unión específica a TLR-4”, en el contexto de la presente invención, se refiere a la asociación física no covalente entre dos moléculas, el aptámero de la invención y el receptor TLR-4. La unión entre el aptámero de la invención y el receptor TLR-4 se considera específica si la fuerza de la unión entre ambos es al menos 10 veces, al menos 15 veces, al menos 20 veces, al menos 25 veces, al menos 50 veces, al menos 75
10 veces o al menos 100 veces superior a la fuerza de la unión entre el aptámero de la invención y una molécula irrelevante. La unión entre el aptámero de la invención y el receptor TLR-4 también se considera específica si la constante de equilibrio de disociación K_d es 10^{-3} M o menor, 10^{-4} M o menor, 10^{-5} M o menor, 10^{-6} M o menor, 10^{-7} M o menor, 10^{-8} M o menor, 10^{-9} M o menor, 10^{-10} M o menor, 10^{-11} M o menor, o 10^{-12} M o menor bajo las
15 condiciones empleadas, por ejemplo, en condiciones fisiológicas, condiciones de cultivo de una célula o condiciones que permiten la supervivencia celular.

La capacidad del aptámero de la invención de unirse específicamente a TLR-4 puede ser determinada mediante una variedad de ensayos que están disponibles en la técnica.
20 Preferiblemente, la capacidad de unión específica a TLR-4 del aptámero de la invención se determina mediante ensayos de unión *in vitro*, tales como el ensayo de oligonucleótido ligado a enzimas (en inglés “*Enzyme-Linked OligoNucleotide Assay*”, ELONA), el ensayo por absorción por aptámero ligado a enzimas (en inglés “*Enzyme-Linked Aptamer Sorbent Assay*”, ELASA), precipitación y PCR cuantitativa (qPCR), o por técnicas de fluorescencia
25 tales como aptahistoquímica, aptacitoquímica, microscopía de fluorescencia o citometría de flujo. Asimismo, tanto la capacidad de unión específica a TLR-4 como la afinidad del aptámero por TLR-4 puede determinarse por técnicas ampliamente conocidas por el experto en la materia, tales como el ensayo de cambio de movilidad en gel (en inglés “*gel mobility shift assay*”), resonancia de plasmón superficial (en inglés “*surface plasmon resonance*”,
30 SPR), electroforesis capilar cinética y el ensayo de unión de fluorescencia. Brevemente, el ensayo de unión de fluorescencia consiste en la incubación de bolas magnéticas recubiertas de TLR-4 con diferentes concentraciones (por ejemplo, de 0 a 100 nM) del aptámero de la invención marcado (por ejemplo, con carboxifluoresceína, FAM), y la posterior elución y detección de los aptámeros unidos; las constantes de disociación (K_d) se calculan por
35 análisis de ajuste no lineal.

El término “inhibición de TLR-4”, en el contexto de la presente invención, se refiere al bloqueo o disminución de la actividad de TLR-4, es decir, la transducción de la señal mediada por el receptor TLR-4. Se considera que la actividad de TLR-4 está inhibida por un agente inhibidor o antagonista cuando su actividad es de al menos el 95%, al menos el 90%, al menos el 85%, al menos el 80%, al menos el 75%, al menos el 70%, al menos el 65%, al menos el 60%, al menos el 55%, al menos el 50%, al menos el 45%, al menos el 40%, al menos el 35%, al menos el 30%, al menos el 25%, al menos el 20%, al menos el 15%, al menos el 10%, al menos el 5%, al menos el 1%, o menor de la actividad de TLR-4 en presencia de su agonista natural LPS.

La capacidad del aptámero de la invención de inhibir a TLR-4 puede ser determinada mediante una variedad de ensayos que están disponibles en la técnica. Preferiblemente, la capacidad de inhibir a TLR-4 del aptámero de la invención se determina mediante ensayos *in vitro* con células que expresan TLR-4 recombinante y un gen reportero cuya expresión está asociada a la activación de TLR-4 recombinante. El experto en la materia reconocerá que existen múltiples variantes de este método, dependiendo de la célula y el gen recombinante empleados. Un ejemplo de este ensayo está recogido en los Ejemplos de la presente invención (sección “Materiales y métodos” y Ejemplo 2). Otras técnicas disponibles incluyen la determinación de los niveles de citoquinas inflamatorias, como IL-1, IL-8, TNF-alfa e IL-12, liberadas por células que expresan TLR-4.

En una realización particular, el aptámero de la invención consiste en de entre 30 y 200 nucleótidos, preferiblemente entre 35 y 150 nucleótidos, más preferiblemente entre 40 y 100 nucleótidos, aún más preferiblemente entre 45 y 80 nucleótidos.

En otra realización particular, el aptámero de la invención comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 3 (GTTGCTCGTATTTAGGGCCACCG GCACGGGACAAGGCGCGGGACGGCGTAGATCAGGTCGACACCAGTCTTCATCCGC) y SEQ ID NO: 4 (GCGGATGAAGACTGGTGTGCCAATAAACCATATCGCCGCGTTAGCATGT ACTCGGTTGGCCCTAAATACGAGCAAC). La secuencia SEQ ID NO: 3 es una variante funcionalmente equivalente de SEQ ID NO: 1 y la secuencia SEQ ID NO: 4 es una variante funcionalmente equivalente de SEQ ID NO: 2.

En una realización particular, el ácido nucleico es ADN. En otra realización particular, el ácido nucleico es ARN. En otra realización particular, el ácido nucleico es APN. En otra

realización particular, el ácido nucleico es ANB. En otra realización particular, el ácido nucleico es ATN.

5 En otra realización particular, el TLR-4 es un TLR-4 seleccionado del grupo formado por ratón, rata, conejo, cerdo, gato, perro, caballo, primate, y ser humano. En una realización preferida, el TLR-4 es un TLR-4 humano.

10 La producción del aptámero de la invención puede llevarse a cabo siguiendo métodos convencionales en la técnica. Ejemplos no limitativos de técnicas de producción de aptámeros incluyen técnicas enzimáticas, tales como la transcripción, sistemas de expresión recombinantes y síntesis química de fase sólida estándar (o de fase de solución), disponibles comercialmente. Cuando sea apropiado, por ejemplo, en el caso de que el aptámero de la invención comprenda variantes de ácidos nucleicos como las descritas anteriormente, análogos de nucleótidos tales como análogos que tienen bases o azúcares
15 modificados químicamente, modificaciones del esqueleto, etc., el aptámero de la invención se producirá mediante síntesis química. Alternativamente, la expresión recombinante será la técnica preferida para la producción de aptámeros cuando estos tengan una longitud de 200 nucleótidos o mayor. Los aptámeros producidos por cualquiera de las técnicas anteriores pueden, opcionalmente, ser purificados por métodos bien conocidos en la técnica.

20

Complejo de la invención

Como el experto en la materia podrá apreciar, las características de pequeño tamaño, estabilidad y fácil producción del aptámero de la invención, hacen que éste pueda
25 presentarse unido a una segunda molécula. Esto es particularmente ventajoso cuando la segunda molécula es un grupo funcional. El resultado de la unión del aptámero de la invención y un grupo funcional es un complejo que exhibe la combinación de funciones de ambos, es decir, un complejo con la capacidad de unirse específicamente e inhibir a TLR-4 y con la actividad asociada al grupo funcional.

30

Por tanto, en otro aspecto, la presente invención se refiere a un complejo, en lo sucesivo denominado el “complejo de la invención”, que comprende un aptámero de ácido nucleico con capacidad de unirse específicamente e inhibir a TLR-4 y que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 o una variante
35 funcionalmente equivalente de las mismas y un grupo funcional.

El término “aptámero” ha sido descrito en detalle en relación con las Definiciones y el Aptámero específico de TLR-4 (*supra*) y sus definiciones y particularidades aplican igualmente en el contexto del complejo de la invención.

- 5 El término “grupo funcional”, en el contexto de la presente invención, se refiere a moléculas aptas para ejercer al menos una función. Dicha función incluye, sin limitación, la capacidad de unirse específicamente a TLR-4 o a otros receptores TLR, la capacidad de inhibir a TLR-4 o a otros receptores TLR, la capacidad de ser detectable, tanto directa como indirectamente, la capacidad de inducir muerte celular, etc. Como el experto en la materia
10 entenderá, un grupo funcional puede tener asociadas una o múltiples funciones. Ejemplos no limitativos de grupos funcionales incluyen reactivos detectables y fármacos. Estos grupos funcionales pueden ser actuar como agentes de imagen, fármacos, etc.

Por lo tanto, en una realización particular, el grupo funcional se selecciona de entre un
15 reactivo detectable y un fármaco.

En otra realización particular, el grupo funcional es un reactivo detectable. El término “reactivo detectable”, en el contexto de la presente invención, se refiere a reactivos con capacidad de ser detectables directa o indirectamente. Ejemplos de reactivos detectables
20 indicados para la presente invención incluyen, sin limitación, radionúclidos, fluoróforos, proteínas y haptenos.

En una realización preferida, el reactivo detectable es un radionúclido. A este efecto, radionúclidos apropiados tienen utilidad en técnicas de diagnóstico por imagen, como
25 técnicas de radioinmunodiagnóstico y tomografía de emisión de positrones (PET). Ejemplos no limitativos de radionúclidos incluyen isótopos de emisión gamma, tales como ^{99m}Tc , ^{123}I y ^{111}In , que pueden ser empleados en radioscintigrafía usando cámaras gamma o gamma cameras o tomografía por emisión de fotón único computarizada, así como emisores de positrones, tales como ^{18}F , ^{64}Cu , ^{68}Ga , ^{86}Y , ^{124}I , ^{213}Bi y ^{211}At , que pueden emplearse en PET,
30 o emisores beta, tales como ^{131}I , ^{90}Y , ^{99m}Tc , ^{177}Lu y ^{67}Cu . El experto en la materia apreciará que los radionúclidos también pueden emplearse con fines terapéuticos.

En otra realización preferida, el reactivo detectable es un fluoróforo. El término “fluoróforo”, en el contexto de la presente invención, se refiere a un compuesto químico fluorescente que
35 puede emitir luz después de ser excitado por una luz de longitud de onda diferente. Fluoróforos adecuados en la presente invención incluyen, sin limitación, Cy3, Cy2, Cy5, la

familia de marcadores fluorescentes Alexa Fluor® (Molecular Probes, Inc.), carboxifluoresceína (FAM) e isotiocianato de fluoresceína (FITC).

En otra realización preferida, el reactivo detectable es una proteína. El término “proteína”, en el contexto de la presente invención, se refiere a macromoléculas consistentes en una o más cadenas de aminoácidos. Las proteínas son responsables de llevar a cabo un grupo diverso de funciones celulares basándose en su habilidad de unir otras moléculas de manera específica. Las proteínas se pueden unir a otras proteínas así como a pequeñas moléculas sustrato. Ejemplos no limitativos de proteínas adecuadas para los propósitos de la presente invención incluyen, sin limitación, enzimas, proteínas fluorescentes, proteínas luminiscentes y antígenos.

En una realización aún más preferida, la proteína es una enzima. El término “enzima”, en el contexto de la presente invención, se refiere a una proteína que funciona como un catalizador altamente selectivo, acelerando tanto la velocidad como la especificidad de la reacción metabólica para la cuál es específica. Ejemplos no limitativos de enzimas adecuadas para la invención incluyen, sin limitación, la peroxidasa de rábano (en inglés “*horseradish peroxydase*”, HRP) y la fosfatasa alcalina. Como el experto en la materia apreciará, las enzimas adecuadas para su uso en la presente invención son detectables indirectamente gracias a su capacidad de catalizar la modificar un sustrato en un compuesto detectable por colorimetría, quimioluminiscencia o fluorimetría. Ejemplos de sustratos adecuados incluyen, sin limitación, *p*-Nitrofenil fostato (PNPP), ácido 2,2'-azinobis[3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico] (ABTS), *o*-fenilenediamina (OPD), y 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB).

Las proteínas bioluminiscentes o fotoproteínas son un caso particular de enzimas oxidativas que son capaces de llevar a cabo una reacción química de sus grupos prostéticos específicos, resultando en una emisión de luz sin necesidad de una excitación previa. Ejemplos no limitativos de proteínas bioluminiscentes incluyen la luciferasa de luciérnaga, la luciferasa de *Renilla* y la acuorina.

En otra realización aún más preferida, la proteína es una proteína fluorescente. El término “proteína fluorescente”, en el contexto de la presente invención, se refiere a una proteína con capacidad emitir luz cuando se excita a una longitud de onda adecuada para su excitación. Ejemplos no limitativos de proteínas fluorescentes que pueden ser utilizadas en el complejo de la invención incluyen, sin limitación, GFP, GFPuv, BFP, CFP, YFP, EBFP2,

mCerulean, mCerulean3, mVenus, mTurquoise, T-Sapphire, citrine, amFP486, zFP506, zFP538, drFP, DsRed, mCherry, dTomato, mTFP1, TagRFP-T, mKO2, mRuby, mKate, mAmetrine, REACh, R-ficoeritrina (R-PE) y Aloficocianina (APC).

5 En otra realización aún más preferida, la proteína es una proteína luminiscente. El término “proteína luminiscente”, en el contexto de la presente invención, se refiere a una proteína capaz de emitir luz cuando se excita a una longitud de onda adecuada para su excitación. Ejemplos no limitativos de proteínas fluorescentes que pueden ser utilizadas en el complejo de la invención incluyen, sin limitación, las proteínas recogidas en la Tabla 1, junto con sus
10 longitudes de onda de excitación y emisión correspondientes.

En otra realización aún más preferida, la proteína es un antígeno. El término “antígeno”, en el contexto de la presente invención, se refiere a una molécula que induce una respuesta inmune en el cuerpo. Por tanto, un antígeno puede ser empleado para generar un
15 anticuerpo que lo reconozca y se una específicamente a él. Ejemplos no limitativos de antígenos incluyen, entre otros, antígenos tumorales, tales como el antígeno carcinoembrionario (CEA), HER2, el antígeno específico de próstata (PSA) y el activador tisular del plasminógeno y sus variantes recombinantes como Activase®, así como antígenos bacterianos, alérgenos, etc. Como el experto en la materia apreciará, los
20 antígenos adecuados para su uso en la presente invención son detectables indirectamente gracias a su capacidad de ser reconocidos específicamente por un anticuerpo.

En otra realización preferida, el reactivo detectable es un hapteno. El término “hapteno”, en el contexto de la presente invención, se refiere a un grupo de compuestos químicos de
25 pequeño tamaño molecular ($< 10,000$ Da) que son antigénicos pero incapaces de inducir por sí mismos una reacción inmunitaria específica. El acoplamiento químico de un hapteno a una proteína inmunógena grande, llamada portador, genera un conjugado hapteno-portador inmunógeno que sí es capaz de inducir una reacción inmunitaria específica. Ejemplos no limitativos de vitaminas incluyen biotina (vitamina B7), digoxigenina, dinitrofenol (DNP) y
30 nitro-iodofenol (NIP). En una realización más preferida, la vitamina es biotina. El término “biotina”, en el contexto de la presente invención, se refiere a una vitamina estable al calor, soluble en agua y alcohol, también denominada vitamina H y vitamina B7, caracterizada por unirse específicamente a avidina con la afinidad más alta descrita hasta la fecha de $K_d = 10^{-15}$ M. Como el experto en la materia apreciará, la biotina es detectable indirectamente
35 gracias a su capacidad de ser reconocida específicamente por la avidina o variantes de la misma como estreptavidina y neutravidina.

En otra realización particular, el grupo funcional es un fármaco. El término “fármaco”, en el contexto de la presente invención, se refiere a una sustancia química empleada en el tratamiento, cura o prevención de una enfermedad o condición, como una patología
 5 caracterizada por un aumento de expresión de TLR-4 y/o un aumento de activación de TLR-4. El término “patología caracterizada por un aumento de expresión de TLR-4 y/o un aumento de activación de TLR-4” se describe en detalle en el contexto de los usos médicos de la invención y su definición y particularidades se incluyen aquí por referencia.

El experto en la materia sabrá inmediatamente cuáles son los agentes están indicados para el tratamiento de una enfermedad en particular. Casi todos los agentes que se indican para el tratamiento de una patología caracterizada por un aumento de expresión de TLR-4 y/o un aumento de activación de TLR-4 pueden estar comprendidos en el complejo de la invención, aunque los agentes antagonistas de TLR-4 y los agentes anti-inflamatorios son
 15 particularmente preferidos. Aunque se pueden utilizar numerosos tipos de fármacos en el contexto de la invención, en una realización preferida, la presente invención contempla que el fármaco se seleccione del grupo que incluye, sin limitación, antagonistas de TLR-4, tales como naloxona, naltrexona, LPS, idulilast, propentofilina, amitriptilina, quetotifeno, ciclobenzaprina, mianserina e imipramina; antiagregantes plaquetarios, tales como aspirina
 20 y clopidogrel; anti-coagulantes, tales como heparina, acenocumarol, warfarina, dabigatrán y rivaroxaban; y antioxidantes, tales como edaravona. Si bien ya se ha mencionado en el contexto de los reactivos detectables, el activador tisular del plasminógeno y sus variantes recombinantes pueden ser igualmente considerados como un fármaco por su acción trombolítica.

La presente invención contempla que el fármaco sea un ácido nucleico. Así, en una realización preferida el fármaco es un ácido nucleico. Ácidos nucleicos aptos como fármacos en el contexto del complejo de la invención incluyen ARN antisentido, ADN antisentido y ARN pequeños de interferencia, que posean la capacidad de silenciar la expresión de genes
 30 implicados en una patología caracterizada por un aumento de expresión de TLR-4 y/o un aumento de activación de TLR-4, que incluyen, sin limitación, los genes *NFKB1*, *RIPK3*, *IFNB1*, *LY96 (MD-2)*, *IRF3*, *TLR3*, *TIRAP (Mal)*, *TICAM1 (TRIF)*, *RIPK1*, *TRAF6*, *CD14*, *TRAM*, *IKBKG (IKK-gamma)*, *IFNA1* y *TLR4*. El término “ARN antisentido”, en el contexto de la presente invención, se refiere a un ARN monocatenario cuya secuencia de nucleótidos es
 35 complementaria para un ARN mensajero diana, interfiriendo por ello con la expresión del gen respectivo. El término “ADN antisentido”, en el contexto de la presente invención, se

refiere a un ADN monocatenario cuya secuencia de nucleótidos es complementaria para un ARN mensajero diana, interfiriendo o silenciando por ello con la expresión del gen respectivo. El término “ARN pequeño de interferencia” o “ARNip” o “siRNA (del inglés *small interfering RNA*)”, en el contexto de la presente invención, se refiere a un ARN bicatenario con una longitud de 20 a 25 nucleótidos que es altamente específico para la secuencia de nucleótidos de su ARN mensajero diana, interfiriendo por ello con la expresión del gen respectivo.

La presente invención contempla que el fármaco sea un péptido. Así, en una realización preferida el fármaco es un péptido. El término “péptido”, en el contexto de la presente invención, se refiere a una cadena corta de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos. El péptido comprenderá al menos 2 aminoácidos, al menos 3 aminoácidos, al menos 4 aminoácidos, al menos 5 aminoácidos, al menos 10 aminoácidos, al menos 15 aminoácidos, al menos 20 aminoácidos, al menos 30 aminoácidos, al menos 40 aminoácidos, al menos 50 aminoácidos, al menos 60 aminoácidos, o al menos 70 aminoácidos. Adecuados para los fines de esta invención son, entre otros, péptidos con capacidad de unirse a una diana y de inducir o inhibir la señalización celular. El término “péptido de unión a diana”, en el contexto de la presente invención, se refiere a un péptido que comprende una región de unión a la diana. El término “péptido de señalización”, en el contexto de la presente invención, se refiere a un péptido con la capacidad de provocar la señalización celular, tales como péptidos agonistas de los receptores de células. Las secuencias de aminoácidos adecuados para la unión de moléculas diana incluyen secuencias de consenso de reconocimiento molecular bien conocido en la técnica.

La unión entre un aptámero de la invención y un grupo funcional para generar el complejo de la invención puede llevarse a cabo mediante técnicas de conjugación ampliamente conocidas por el experto en la materia. El resultado es una unión covalente entre el aptámero de la invención y el grupo funcional. La conjugación puede implicar la unión de aminas primarias de los extremos 3' o 5' del aptámero de la invención al grupo funcional durante la síntesis química del aptámero. Alternativamente, la conjugación puede efectuarse mediante reacciones convencionales de reacción cruzada (en inglés “*cross-linking*”), que tienen la ventaja de la reactividad química mucho mayor de etiquetas de alquil-amina primarias frente a las aminas de arilo de los propios nucleótidos. Los métodos de conjugación son bien conocidos en la técnica y se basan en el uso de reactivos de reticulación (en inglés “*cross-linking reagents*”). Los reactivos de reticulación contienen al menos dos grupos reactivos, que se dirigen a grupos tales como aminas primarias,

sulfhidrilos, aldehídos, carboxilos, hidroxilos, azidas y así sucesivamente, en la molécula a ser conjugada. Los agentes de reticulación difieren en la especificidad química, la longitud del brazo espaciador, composición brazo espaciador, brazo espaciador de escisión, y la estructura. Por ejemplo, la conjugación de complejos según la invención puede llevarse a cabo directamente o a través de un resto enlazador, a través de uno o más grupos no funcionales en el aptámero y/o el grupo funcional, tales como grupos amina, carboxilo, fenilo, tiol o hidroxilo. Se puede lograr enlaces más selectivos mediante el uso de un enlazador heterobifuncional. Enlazadores convencionales pueden ser utilizados, tales como diisocyanatos, diisotiocianatos, bis (hidroxisuccinimida) ésteres, carbodiimidas, ésteres de maleimida-hidroxisuccinimida, glutaraldehído y similares, o hidrazinas e hidrazidas, tales como 4-(4-N-maleimidofenil)hidrazida de ácido butírico (MPBH).

Otra aproximación consiste en el marcaje de los aptámeros durante la síntesis por PCR mediante el empleo de cebadores marcados, por ejemplo, con un fluoróforo. Para ello, existen diversas casas comerciales disponibles para el experto en la materia.

Adicionalmente, en la realización particular en la que el grupo funcional sea un radionúclido, la unión entre un aptámero según la invención y el radionúclido puede llevarse a cabo mediante coordinación química, en donde los átomos del aptámero implicados en la unión donan electrones al radionúclido. Las reacciones de coordinación son ampliamente conocidas en la técnica y dependerán del radionúclido y el grupo reactivo implicado en el aptámero.

Usos in vitro de la invención

A. Usos in vitro para detectar TLR-4

La presente invención también contempla usos *in vitro* de un aptámero de ácido nucleico con capacidad de unirse específicamente e inhibir a TLR-4 y que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 o una variante funcionalmente equivalente de las mismas, y de un complejo que comprende un aptámero de ácido nucleico con capacidad de unirse específicamente e inhibir a TLR-4 y que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 o una variante funcionalmente equivalente de las mismas y un grupo funcional, para detectar TLR-4.

Por lo tanto, en otro aspecto, la presente invención se refiere a un uso *in vitro* de un aptámero de ácido nucleico con capacidad de unirse específicamente e inhibir a TLR-4 y que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 o una variante funcionalmente equivalente de las mismas para detectar TLR-4.

Así, la capacidad de un aptámero según la invención de unirse específicamente a TLR-4 puede ser explotada para la detección indirecta de TLR-4 a través del aptámero según la invención. Para este propósito, el experto en la materia reconocerá que es necesaria una posterior detección de dicho aptámero. Las técnicas de detección de aptámeros son ampliamente conocidas en la técnica e incluyen, por ejemplo, el empleo de anticuerpos o de sondas específicas frente al aptámero. De esta manera, una vez que el aptámero según la invención está unido a TLR-4, se aplicaría un anticuerpo o sonda específica para el aptámero, que a su vez pueden estar marcados con un reactivo detectable, o que pueden ser detectados de manera indirecta mediante un anticuerpo o sonda secundaria. La técnica empleada para detectar TLR-4 dependerá entonces del tipo de reactivo detectable, pudiendo ser técnicas basadas, por ejemplo, en fluorimetría, colorimetría o radiactividad.

El término “sonda” o “sonda de hibridación”, en el contexto de la presente invención, se refiere a un fragmento de ADN o ARN de longitud variable, generalmente entre 10 y 1000 bases de longitud, que se utiliza para detectar la presencia de ácidos nucleicos de cadena sencilla (ADN o ARN) que son complementarios a la secuencia en la sonda. La sonda se hibrida al ácido nucleico de cadena sencilla diana, cuya secuencia de bases permite el emparejamiento de bases debido a la complementariedad entre la sonda y el ácido nucleico diana. Para detectar la hibridación de la sonda a su secuencia diana, la sonda está marcada con un reactivo detectable, tales como un radionúclido, un fluoróforo o digoxigenina, entre otros.

La detección de TLR-4 con el aptámero de la invención se puede llevar a cabo mediante ensayos de unión *in vitro*, tales como el ensayo de oligonucleótido ligado a enzimas (en inglés “*Enzyme-Linked OligoNucleotide Assay*”, ELONA), el ensayo por absorción por aptámero ligado a enzimas (en inglés “*Enzyme-Linked Aptamer Sorbent Assay*”, ELASA), precipitación y PCR cuantitativa (qPCR), ensayo de cambio de movilidad en gel (en inglés “*gel mobility shift assay*”), Western Blotting, resonancia de plasmón superficial (en inglés “*surface plasmon resonance*”, SPR), electroforesis capilar cinética, el ensayo de unión de

fluorescencia, aptahistoquímica, aptacitoquímica, microscopía de fluorescencia o citometría de flujo.

En otra realización particular de los usos *in vitro* de la invención, la detección de TLR-4 se realiza mediante un método seleccionado del grupo que consiste en ELONA, aptacitoquímica, aptahistoquímica y citometría de flujo.

El término "ELONA" o "ensayo de oligonucleótido ligado a enzimas" (en inglés "*Enzyme-Linked OligoNucleotide Assay*"), en el contexto de la presente invención, se refiere a una técnica análoga al inmunoensayo por absorción ligado a enzimas (en inglés "*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*", ELISA), en donde el anticuerpo que se emplea para detectar la molécula de interés, en este caso TLR-4, se intercambia por un aptámero de detección específico para dicha molécula. El ensayo ELISA está basado en el uso de antígenos o anticuerpo marcados, por ejemplo con enzimas, de manera que los complejos formados entre el antígeno diana y el anticuerpo marcado son complejos enzimáticamente activos. Puesto que uno de los componentes, en este caso el antígeno, está inmovilizado en un soporte, los complejos antígeno:anticuerpo están inmovilizados al soporte y, por tanto, pueden ser detectados mediante la adición de un sustrato específico de la enzima. En el caso de ELONA, el aptámero de detección puede estar unido covalentemente a una enzima, o puede en sí ser detectado por un anticuerpo secundario específico del aptámero que esté conjugado a una enzima. Dicha enzima cataliza la transformación de un sustrato específico para producir una señal visible. Esta técnica se puede modificar para intercambiar la enzima por otro reactivo detectable, como puede ser un fluoróforo. En el presente documento se emplean los términos ELONA y ELASA, o ensayo por absorción por aptámero ligado a enzimas (en inglés "*Enzyme-Linked Aptamer Sorbent Assay*"), indistintamente. En una realización preferida la detección de TLR-4 se realiza mediante ELONA.

De manera análoga, los términos "aptacitoquímica" y "aptahistoquímica", en el contexto de la presente invención, se refieren a técnicas análogas a la inmunocitoquímica e inmunohistoquímica para la detección de TLR-4 sobre células y cortes histológicos, respectivamente, en donde el anticuerpo que se emplea para detectar la molécula de interés, en este caso TLR-4, se intercambia por un aptámero específico para dicha molécula. El aptámero de detección puede estar unido covalentemente a una enzima, o puede en sí ser detectado por un anticuerpo secundario específico del aptámero que esté conjugado a una enzima. Dicha enzima cataliza la transformación de un sustrato específico para producir una señal visible. Esta técnica se puede modificar para intercambiar la enzima

por otro reactivo detectable, como puede ser un fluoróforo. En una realización preferida la detección de TLR-4 se realiza mediante aptacitoquímica. En otra realización preferida la detección de TLR-4 se realiza mediante aptahistoquímica.

- 5 Alternativamente, el experto en la materia reconocerá que estas técnicas (ELONA, aptacitoquímica, aptahistoquímica) se pueden adaptar para intercambiar el anticuerpo de detección por una sonda específica del aptámero.

El término "citometría de flujo", en el contexto de la presente invención, se refiere a una técnica de análisis celular que implica medir las características de dispersión de luz y fluorescencia que poseen las células conforme se las hace pasar a través de un rayo de luz. Además de la dispersión de la luz, si previamente a su análisis se coloca a las células en presencia de aptámeros marcados con moléculas fluorescentes, se pueden evaluar que células poseen los antígenos complementarios a los aptámeros usados. La detección de fluorescencia se realiza con citofluorímetros de flujo (los conocidos como "citómetros" o "FACS" (en inglés "*Fluorescence-Activated Cell Sorter*"). Esta técnica, al igual que las anteriores, se desarrolló inicialmente para su uso con anticuerpos marcados fluorescentemente pero se puede adaptar fácilmente para su uso con el aptámero de la invención.

20 Como el experto en la materia apreciará, un complejo que comprende un aptámero de ácido nucleico con capacidad de unirse específicamente e inhibir a TLR-4 y que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 o una variante funcionalmente equivalente de las mismas y un reactivo detectable es particularmente ventajoso para detectar TLR-4, puesto que dicho reactivo detectable posibilita la detección del aptámero comprendido en el complejo cuando está unido a TLR-4. La técnica empleada para detectar TLR-4 dependerá del tipo de reactivo detectable, pudiendo ser técnicas basadas, por ejemplo, en fluorimetría, colorimetría o radiactividad.

30 Así, en otro aspecto, la presente invención se refiere un complejo que comprende un aptámero de ácido nucleico con capacidad de unirse específicamente e inhibir a TLR-4 y que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 o una variante funcionalmente equivalente de las mismas y un grupo funcional para detectar TLR-4.

35 En una realización particular, el grupo funcional es un reactivo detectable.

En otra realización particular de los usos *in vitro* de la invención, la detección de TLR-4 se realiza mediante un método seleccionado del grupo que consiste en ELONA, aptacitoquímica, aptahistoquímica y citometría de flujo.

5

Los términos “aptámero”, “TLR-4”, “complejo”, “grupo funcional”, “reactivo detectable”, “ELONA”, “aptacitoquímica”, “aptahistoquímica” y “citometría de flujo” han sido descritos en detalle anteriormente y sus definiciones y particularidades se incluyen aquí por referencia.

10 Dado que las técnicas de ELISA, inmunocitoquímica, inmunohistoquímica y citometría de flujo son bien conocidas en la técnica, el experto en la materia podrá realizar las adaptaciones necesarias para intercambiar el anticuerpo por el aptámero o complejo según la invención sin necesidad de realizar una experimentación indebida.

15 *B. Usos in vitro para inhibir TLR-4*

Tal y como se ha descrito con anterioridad, un aptámero de ácido nucleico con capacidad de unirse específicamente e inhibir a TLR-4 y que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 o una variante funcionalmente
 20 equivalente de las mismas puede inhibir la actividad de TLR-4, reduciendo los niveles de citoquinas pro-inflamatorias liberadas como resultado de su activación. La presente invención también contempla usos *in vitro* de un aptámero de ácido nucleico con capacidad de unirse específicamente e inhibir a TLR-4 y que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 o una variante funcionalmente
 25 equivalente de las mismas, y de un complejo que comprende un aptámero de ácido nucleico con capacidad de unirse específicamente e inhibir a TLR-4 y que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 o una variante funcionalmente equivalente de las mismas y un grupo funcional, para inhibir TLR-4.

30 Por tanto, en otro aspecto, la presente invención se refiere a un uso *in vitro* de un aptámero de ácido nucleico con capacidad de unirse específicamente e inhibir a TLR-4 y que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 o una variante funcionalmente equivalente de las mismas para inhibir TLR-4.

35 En otro aspecto, la presente invención se refiere a un uso *in vitro* de un complejo que comprende un aptámero de ácido nucleico con capacidad de unirse específicamente e

inhibir a TLR-4 y que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 o una variante funcionalmente equivalente de las mismas y un grupo funcional, para inhibir TLR-4.

5 Métodos *in vitro* de la invención

A. Métodos *in vitro* para la detección de TLR-4

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método *in vitro* para la detección de TLR-4 en una muestra, en adelante “el primer método *in vitro* de detección de TLR-4 de la invención” que comprende

- i) poner en contacto dicha muestra con un aptámero de ácido nucleico con capacidad de unirse específicamente e inhibir a TLR-4 y que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 o una variante funcionalmente equivalente de las mismas,
- ii) separar el aptámero no unido a TLR-4, y
- iii) detectar la presencia del aptámero unido al TLR-4 presente en la muestra.

En una primera etapa, el primer método *in vitro* de detección de la invención comprende poner en contacto dicha muestra con un aptámero de ácido nucleico con capacidad de unirse específicamente e inhibir a TLR-4 y que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 o una variante funcionalmente equivalente de las mismas.

Los términos “aptámero” y “TLR-4” han sido descritos en detalle anteriormente y sus definiciones y particularidades se incluyen aquí por referencia.

El término “muestra” o “muestra biológica”, en el contexto de la presente invención, se refiere a un cultivo celular o al material biológico aislado de un sujeto. La muestra biológica puede contener cualquier material biológico adecuado para detectar el biomarcador deseado y puede comprender células y/o material no celular del sujeto. La muestra se puede aislar de cualquier tejido adecuado o fluido biológico tal como, por ejemplo, sangre, plasma, suero, orina, líquido cefalorraquídeo (LCR), corazón, cerebro. Las muestras utilizadas para la detección de TLR-4 son preferiblemente fluidos biológicos. .

De manera alternativa, las muestras son muestras de biofluidos. Los términos "fluido biológico" y "biofluido" se utilizan indistintamente en el presente documento y se refieren a fluidos acuosos de origen biológico. El biofluido se puede obtener de cualquier localización (tales como sangre, plasma, suero, orina, bilis, líquido cefalorraquídeo, humor vítreo o acuoso, o cualquier secreción corporal), un exudado (como el líquido obtenido de un absceso o cualquier otro sitio de infección o inflamación), o el líquido obtenido de una articulación (tal como una articulación normal o una articulación afectada por una enfermedad como la artritis reumatoide). Los biofluidos utilizados para la detección de TLR-4 son preferiblemente muestras de sangre, plasma, suero o líquido cefalorraquídeo.

El aptámero según la invención se aplica sobre la muestra en un tampón adecuado para permitir la unión del aptámero a las moléculas de TLR-4 que puedan estar presentes en la muestra. Ejemplos no limitativos de tampones adecuados para permitir la unión del aptámero de la invención y TLR-4 incluyen PBS, TBS, tampón fosfato y tampón citrato.

Preferiblemente, estos tampones contienen 1mM $MgCl_2$. La cantidad de aptámero necesaria para detectar las moléculas de TLR-4 presentes en la muestra dependerá tanto del tamaño de la muestra como de la cantidad de TLR-4 presente en la misma, y se podrá determinar fácilmente por procedimientos de optimización que son habituales en la técnica. De manera orientativa, la concentración de aptámero es de al menos 1 fM, al menos 10 fM, al menos 100 fM, al menos 1 pM, al menos 10 pM, al menos 100 pM, al menos 1 nM, al menos 10 nM, al menos 100 nM, al menos 1 μM , al menos 10 μM , al menos 100 μM o más. Preferiblemente, la concentración de aptámero es de entre 100 fM y 1 μM , más preferiblemente entre 1 pM y 100 nM, aún más preferiblemente entre 100 pM y 1 nM.

El aptámero se incuba con la muestra a una temperatura adecuada y durante un tiempo suficiente para permitir la unión del aptámero a las moléculas de TLR-4 que puedan estar presentes en la muestra. La temperatura es, preferiblemente, entre 20°C y 37°C. De manera orientativa, el aptámero se incubará con la muestra durante al menos 5 min, al menos 10 min, al menos 15 min, al menos 20 min, al menos 30 min, al menos 60 min, al menos 120 min o más.

Una vez que el aptámero se ha unido a las moléculas de TLR-4 que puedan estar presentes en la muestra, en una segunda etapa la muestra se lava para eliminar las moléculas de aptámero que no se hayan unido a TLR-4.

En una tercera etapa se detecta la presencia del aptámero unido al TLR-4 presente en la muestra. Puesto que el aptámero de la invención no es en sí mismo una molécula detectable, la etapa de detección es una etapa de detección indirecta a través de una segunda molécula detectable que se une específicamente al aptámero. La detección del aptámero unido a TLR-4 puede llevarse a cabo con prácticamente cualquier anticuerpo o reactivo conocido que se una con alta afinidad al aptámero de la invención. No obstante, es preferible el uso de un anticuerpo específico frente al aptámero, por ejemplo, suero policlonal, sobrenadantes de hibridoma, anticuerpos monoclonales o humanizados y fragmentos de los mismos. Dicho anticuerpo específico del aptámero está convenientemente marcado con un reactivo detectable. El término “reactivo detectable” ha sido descrito en detalle anteriormente y su definición y particularidades se incluyen aquí por referencia. Dicho reactivo se puede detectar por medio de fluorimetría o colorimetría utilizando aparatos adecuados para el tipo de reactivos y el tipo de muestra, que son conocidos para el experto en la materia. A modo de ejemplo, la muestra con el aptámero unido a las moléculas de TLR-4 presentes se incuba con un anticuerpo específico del aptámero está conjugado con una enzima, en condiciones similares a las condiciones de incubación con el aptámero, y los complejos TLR-4-aptámero-anticuerpo se detectan con la adición de un sustrato que es convertido por la enzima a un producto detectable, por ejemplo, por medio de fluorimetría en un microscopio de fluorescencia o por colorimetría en un espectrofotómetro. Alternativamente, la detección se puede realizar de manera análoga mediante el empleo de una sonda específica del aptámero marcada convenientemente con un reactivo detectable.

El experto en la materia reconocerá que el primer método *in vitro* de la invención puede llevarse a cabo como parte de técnicas de detección tales como ELONA, ELASA, precipitación y qPCR, ensayo de cambio de movilidad en gel, Western Blotting, resonancia de plasmón superficial, electroforesis capilar cinética, ensayo de unión de fluorescencia, aptahistoquímica, aptacitoquímica, microscopía de fluorescencia o citometría de flujo.

Alternativamente, el aptámero según la invención puede estar unido a un grupo funcional formando parte de un complejo según la invención. Por lo tanto, en otro aspecto, la presente invención se refiere a un método *in vitro* para la detección de TLR-4 en una muestra, en adelante “el segundo método *in vitro* de detección de TLR-4 de la invención”, que comprende

- i) poner en contacto dicha muestra con un complejo que comprende un aptámero de ácido nucleico con capacidad de unirse específicamente e inhibir a TLR-4 y que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1

y SEQ ID NO: 2 o una variante funcionalmente equivalente de las mismas y un grupo funcional,

- ii) separar el aptámero o complejo no unido a TLR-4, y
- iii) detectar la presencia del complejo unido al TLR-4 presente en la muestra.

5

Los términos "aptámero", "TLR-4" y "muestra" han sido descritos en detalle anteriormente y sus definiciones y particularidades se incluyen aquí por referencia. De igual forma, las particularidades de la primera y segunda etapas del primer método *in vitro* de detección de la invención aplican también al segundo método *in vitro* de detección de la invención y se incluyen igualmente por referencia.

10

La tercera etapa del segundo método *in vitro* de detección de la invención comprende detectar la presencia del complejo de la invención unido al TLR-4 presente en la muestra. La detección del complejo según la invención puede llevarse a cabo con prácticamente cualquier anticuerpo o reactivo conocido que se una con alta afinidad al aptámero de la invención o al grupo funcional. La detección del aptámero de la invención se ha descrito en detalle en el contexto del primer método *in vitro* de detección de la invención. De igual manera, en relación con el grupo funcional, la detección también puede llevarse a cabo con prácticamente cualquier anticuerpo o reactivo conocido que se una con alta afinidad a dicho grupo funcional. Por esta razón, es particularmente conveniente para el segundo método *in vitro* de detección de la invención que el grupo funcional sea un reactivo detectable.

15

20

En una realización particular el grupo funcional es un reactivo detectable seleccionado del grupo formado por radionúclidos, fluoróforos, proteínas y haptenos.

25

Los términos "radionúclido", "fluoróforo", "proteína detectable" y "hapteno" han sido descritos en detalle anteriormente y sus definiciones y particularidades se incluyen aquí por referencia.

30

Como apreciará el experto en la materia, los reactivos detectables contemplados por la presente invención se pueden dividir entre los reactivos que son directamente detectables por sí mismos, como los radionúclidos o los fluoróforos, y los reactivos que son indirectamente detectables, tales como las proteínas o los haptenos.

35

En una realización preferida, el reactivo detectable es un radionúclido y la detección se realiza por detección de la radiación emitida por el radionúclido. Dicha radiación dependerá

del tipo de radionúclido, pudiendo ser una emisión de partículas α , partículas β o emisión de tipo γ . A este efecto, son ampliamente conocidas las técnicas de detección adecuadas para los diferentes radionúclidos. A modo de ejemplo, la emisión emitida por ^{123}I puede ser detectada por una cámara gamma.

5

En otra realización preferida, el reactivo detectable es un fluoróforo y la detección se realiza por detección de la fluorescencia emitida por el fluoróforo. El empleo de un fluoróforo requiere la excitación previa del mismo con una longitud de onda dentro de su espectro de excitación, lo cual provoca una emisión a una longitud de onda diferente. Las longitudes de

10 onda de excitación y de emisión de los fluoróforos contemplados en la presente invención forman parte del estado de la técnica. La fluorescencia emitida puede detectarse, por ejemplo, por técnicas de fluorimetría empleando un espectrofotómetro de fluorescencia o un microscopio de fluorescencia.

15 En otra realización preferida, el reactivo detectable es una proteína. Ésta se podrá detectar dependiendo del tipo de proteína utilizada. Por ejemplo:

- una enzima requiere la adición de su sustrato específico que será detectable por colorimetría, quimioluminiscencia o fluorimetría;
- una proteína fluorescente, al igual que un fluoróforo, requiere la excitación a una
- 20 longitud de onda adecuada para ser detectable por fluorimetría (por ejemplo, las longitudes de onda recogidas en la Tabla 1);
- un antígeno o un hapteno requiere un anticuerpo u otra molécula que lo reconozca específicamente. Para poder ser detectado, dicho anticuerpo o molécula específica para el antígeno/hapteno necesita estar marcado, por ejemplo, con una enzima, y la
- 25 detección dependerá del tipo de marcaje.

El experto en la materia reconocerá que el segundo método *in vitro* de la invención puede llevarse a cabo como parte de técnicas de detección tales como ELONA, ELASA, precipitación y qPCR, ensayo de cambio de movilidad en gel, Western Blotting, resonancia

30 de plasmón superficial, electroforesis capilar cinética, ensayo de unión de fluorescencia, aptahistoquímica, aptacitoquímica, microscopía de fluorescencia o citometría de flujo.

En una realización particular, la detección de TLR-4 se realiza por medio de fluorescencia.

35 *B. Métodos in vitro para la inhibición de TLR-4*

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método *in vitro* para inhibir TLR-4 en una muestra, en adelante “el primer método *in vitro* de inhibición de TLR-4 de la invención”, que comprende poner en contacto una muestra que comprende TLR-4 con un aptámero de ácido nucleico con capacidad de unirse específicamente e inhibir a TLR-4 y que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 o una variante funcionalmente equivalente de las mismas, en condiciones adecuadas inhibir TLR-4.

Los términos “aptámero”, “TLR-4”, “inhibición de TLR-4” y “muestra” han sido descritos en detalle anteriormente y sus definiciones y particularidades se incluyen aquí por referencia.

En una realización particular, el TLR-4 de la muestra está comprendido en células vivas.

El primer método *in vitro* de inhibición de TLR-4 de la invención comprende poner en contacto una muestra que comprende TLR-4 con un aptámero de acuerdo con la invención en condiciones adecuadas inhibir TLR-4. Para ello, el aptámero se aplica de la invención sobre la muestra y se debe unir a TLR-4.

El término “condiciones adecuadas inhibir TLR-4”, en el contexto de la presente invención, se refiere a las condiciones de incubación que permiten la unión del aptámero de invención a TLR-4 y su posterior inhibición. Estas condiciones incluyen la composición del tampón en el que se aplica el aptámero de la invención sobre la muestra, la cantidad de aptámero, el tiempo de incubación y la temperatura de incubación. Ejemplos no limitativos de tampones adecuados para permitir la unión del aptámero de la invención a TLR-4 y su inhibición incluyen PBS, TBS, tampón fosfato y tampón citrato. Preferiblemente, estos tampones contienen 1mM MgCl₂. La cantidad de aptámero necesaria para detectar las moléculas de TLR-4 presentes en la muestra dependerá tanto del tamaño de la muestra como de la cantidad de TLR-4 presente en la misma, y se podrá determinar fácilmente por procedimientos de optimización que son habituales en la técnica. De manera orientativa, la concentración de aptámero es de al menos 1 fM, al menos 10 fM, al menos 100 fM, al menos 1 pM, al menos 10 pM, al menos 100 pM, al menos 1 nM, al menos 10 nM, al menos 100 nM, al menos 1 μM, al menos 10 μM, al menos 100 μM o más. Preferiblemente, la concentración de aptámero es de entre 100 fM y 1 μM, más preferiblemente entre 1 pM y 100 nM, aún más preferiblemente entre 100 pM y 1 nM.

El aptámero se incuba con la muestra a una temperatura adecuada y durante un tiempo suficiente para permitir la unión del aptámero a las moléculas de TLR-4 que puedan estar presentes en la muestra. La temperatura es, preferiblemente, entre 20°C y 37°C, más preferiblemente 37°C. De manera orientativa, el aptámero se incubará con la muestra durante al menos 5 min, al menos 10 min, al menos 15 min, al menos, 20 min, al menos 30 min, al menos 60 min, al menos 120 min o más.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método *in vitro* para inhibir TLR-4 en una muestra, en adelante “el segundo método *in vitro* de inhibición de TLR-4 de la invención”, que comprende poner en contacto una muestra que comprende TLR-4 con un complejo que comprende un aptámero de ácido nucleico con capacidad de unirse específicamente e inhibir a TLR-4 y que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 o una variante funcionalmente equivalente de las mismas y un grupo funcional en condiciones adecuadas inhibir TLR-4.

Los términos “aptámero”, “TLR-4”, “inhibición de TLR-4”, “muestra” y “condiciones adecuadas inhibir TLR-4” han sido descritos en detalle anteriormente y sus definiciones y particularidades se incluyen aquí por referencia.

Usos médicos de la invención

Los autores de la presente invención han demostrado que el aptámero de la invención es capaz de bloquear o inhibir el volumen de infarto producido en un modelo de ictus inducido en animales de experimentación, como se describe en el Ejemplo 4. Por lo tanto, la capacidad del aptámero de la invención de unirse específicamente e inhibir a TLR-4 hace que éste tenga una utilidad terapéutica. Es aparente que el efecto terapéutico obtenido con el aptámero de la invención puede ser complementado con un grupo funcional con actividad terapéutica, tal y como se ha descrito en el contexto del complejo de la invención. En consecuencia, la presente invención contempla los usos médicos del aptámero de la invención y del complejo de la invención.

A. Usos médicos del aptámero de la invención

En otro aspecto, la presente invención se refiere un aptámero de ácido nucleico con capacidad de unirse específicamente e inhibir a TLR-4 y que comprende una secuencia

seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 o una variante funcionalmente equivalente de las mismas para su uso en medicina.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un aptámero de ácido nucleico con capacidad de unirse específicamente e inhibir a TLR-4 y que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 o una variante funcionalmente equivalente de las mismas para su uso en la fabricación de un medicamento para el tratamiento una patología caracterizada por un aumento de expresión de TLR-4 y/o un aumento de activación de TLR-4.

Alternativamente, se puede expresar como el uso de un aptámero de ácido nucleico con capacidad de unirse específicamente e inhibir a TLR-4 y que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 o una variante funcionalmente equivalente de las mismas para su uso en el tratamiento de una patología caracterizada por un aumento de expresión de TLR-4 y/o un aumento de activación de TLR-4.

Alternativamente, se puede expresar como método *in vivo* de tratamiento de una patología caracterizada por un aumento de expresión de TLR-4 y/o un aumento de activación de TLR-4 en un sujeto, que comprende la administración a dicho sujeto de una cantidad terapéuticamente efectiva de un aptámero de ácido nucleico con capacidad de unirse específicamente e inhibir a TLR-4 y que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 o una variante funcionalmente equivalente de las mismas a dicho sujeto.

De acuerdo con la invención, un aptámero de ácido nucleico con capacidad de unirse específicamente e inhibir a TLR-4 y que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 o una variante funcionalmente equivalente de las mismas se une específicamente a TLR-4 en la superficie de un célula diana. Al contactar el aptámero de la invención a TLR-4 inhibe su actividad, resultando en una reducción o interrupción en la liberación de citoquinas pro-inflamatorias tales como IL-1, IL-8, TNF-alfa e IL-12.

El término “aptámero” ha sido descrito en detalle en relación con las Definiciones y el Aptámero específico de TLR-4 (*supra*) y sus definiciones y particularidades aplican igualmente en el contexto del complejo de la invención.

El término "tratamiento" o "terapia", en el contexto de la presente invención, se refiere a la intervención clínica en un intento de prevenir, curar, retrasar, reducir la gravedad de, o mejorar uno o más síntomas de la patología caracterizada por un aumento de expresión de TLR-4 y/o un aumento de activación de TLR-4, o con el fin de prolongar la supervivencia de un paciente más allá de lo esperado en la ausencia de tal tratamiento.

El término "célula diana", en el contexto de la presente invención, se refiere a la célula particular que expresa TLR-4, que incluye, entre otras, células del linaje mieloide como monocitos, macrófagos, células de microglía, granulocitos y células dendríticas inmaduras, así como células de otros linajes tales como neuronas, etc. En una realización particular, la célula diana es un monocito o un macrófago. En otra realización particular, la célula diana es una célula de microglía. En otra realización particular, la célula diana es un granulocito. En otra realización particular, la célula diana es una célula dendrítica inmadura. En otra realización particular, la célula diana es una neurona.

En una realización particular, la célula diana es una célula de mamífero. En otra realización preferida, la célula de mamífero es una célula humana.

El término "sujeto" o "individuo" se refiere a un miembro de una especie de mamífero, e incluye, pero no se limita a animales domésticos, y los primates incluidos los seres humanos; el sujeto es preferiblemente un ser humano, hombre o mujer, de cualquier edad o raza.

El término "una cantidad terapéuticamente efectiva", en el contexto de la presente invención, se refiere a la cantidad del aptámero de la invención que se requiere para alcanzar una prevención, curación, retraso, reducción de la gravedad de, o mejora de uno o más síntomas apreciables de la patología caracterizada por un aumento de expresión de TLR-4 y/o un aumento de activación de TLR-4.

El término "patología caracterizada por un aumento de expresión de TLR-4 y/o un aumento de activación de TLR-4", en el contexto de la presente invención, se refiere a una patología en la que las células que expresan TLR-4 muestran un aumento de expresión de TLR-4 y/o un aumento de activación de TLR-4 con respecto a condiciones fisiológicas normales o de referencia o valores de referencia, y en la que dichas células están directa o indirectamente implicadas independientemente de que TLR-4 sea o no el responsable de la enfermedad.

Dado que la activación de TLR-4 produce una cascada de señalización que da como resultado la liberación de citoquinas inflamatorias como IL-1, IL-8, TNF-alfa e IL-12, provocando inflamación y daño celular, la patología caracterizada por un aumento de expresión de TLR-4 y/o un aumento de activación de TLR-4 puede estar caracterizada, además, por tener un componente inflamatorio.

En una realización particular, dicha patología caracterizada por un aumento de expresión de TLR-4 y/o un aumento de activación de TLR-4 se selecciona del grupo formado, entre otros, por ictus, infarto agudo de miocardio, sepsis, aterosclerosis, esclerosis múltiple, artritis reumatoide y drogadicción.

En una realización preferida, dicha patología caracterizada por un aumento de expresión de TLR-4 y/o un aumento de activación de TLR-4 es ictus. El término “ictus” o “enfermedad cerebrovascular” o “infarto cerebral” o “apoplejía”, en el contexto de la presente invención, se refiere a una patología caracterizada por un déficit neurológico ocasionado por una disminución importante del flujo sanguíneo cerebral, de forma anormalmente brusca (ictus isquémico) o bien, por la hemorragia originada por la rotura de un vaso cerebral (ictus hemorrágico). En el ictus isquémico se pierde la irrigación sanguínea debido a la interrupción súbita e inmediata del flujo sanguíneo, lo que genera la aparición de una zona infartada debido a la oclusión de alguna de las arterias que irrigan la masa encefálica, ya sea por acumulación de fibrina o de calcio o por alguna anomalía en los eritrocitos, pero generalmente es por aterosclerosis o bien por un émbolo (embolia cerebral) que procede de otra localización, fundamentalmente el corazón u otras arterias. En el ictus hemorrágico, se produce la rotura de un vaso sanguíneo encefálico que, por una parte, priva de riego al área cerebral dependiente de esa arteria, pero por otra parte la sangre extravasada ejerce compresión sobre las estructuras cerebrales, incluidos otros vasos sanguíneos, lo que aumenta el área afectada.

En una realización preferida, dicha patología caracterizada por un aumento de expresión de TLR-4 y/o un aumento de activación de TLR-4 es infarto agudo de miocardio. El término “infarto agudo de miocardio” o “infarto” o “ataque al corazón”, en el contexto de la presente invención, se refiere a una patología caracterizada por un riego sanguíneo insuficiente, con daño tisular, en una parte del corazón, producido por una obstrucción en una de las arterias coronarias. La isquemia o suministro deficiente de oxígeno que resulta de tal obstrucción produce la angina de pecho, que si se recanaliza precozmente no produce muerte del tejido

cardíaco, mientras que si se mantiene esta anoxia se produce la lesión del miocardio y finalmente la necrosis, es decir, el infarto.

En una realización preferida, dicha patología caracterizada por un aumento de expresión de TLR-4 y/o un aumento de activación de TLR-4 es sepsis. El término “sepsis” o “septicemia”, en el contexto de la presente invención, se refiere al síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS) provocado por una infección, generalmente grave. Esta reacción del organismo se produce como respuesta a la presencia de microorganismos patógenos en cualquier tejido o fluido del organismo, y está causada por la acción del propio sistema inmune, que libera sustancias pro-inflamatorias que ponen en marcha el SRIS. Se caracteriza por la presencia de al menos dos de los siguientes criterios: fiebre, hipertermia, taquipnea, taquicardia y leucocitosis.

En una realización preferida, dicha patología caracterizada por un aumento de expresión de TLR-4 y/o un aumento de activación de TLR-4 es aterosclerosis. El término “aterosclerosis”, en el contexto de la presente invención, se refiere a un síndrome o patología caracterizado por el depósito e infiltración de sustancias lipídicas en las paredes de las arterias de mediano y grueso calibre. Las células de la pared arterial interpretan este depósito como una invasión y activan a los monocitos circulantes sistema inmune, que penetran en la pared de la arteria, se transforman en macrófagos y comienzan a fagocitar partículas de LDL generando un proceso inflamatorio. La inflamación provoca a su vez la multiplicación y migración de las células musculares lisas de la pared, que van produciendo estrechamientos de la luz arterial. Los engrosamientos concretos son denominados placa de ateroma. Es la forma más común de arteriosclerosis. Las enfermedades que forman el síndrome de aterosclerosis y que se caracterizan por afectación de las arterias por placas de ateroma y en consecuencia obstrucción al flujo sanguíneo o isquemia son, dependiendo de la arteria del órgano afectado:

- Cardiopatía isquémica, con su máximo representante el infarto agudo de miocardio, en el corazón.
- Enfermedad cerebrovascular, en forma de ictus o trombosis cerebral o hemorragia cerebral, en el sistema nervioso central.
- Claudicación intermitente, con su máxima gravedad de isquemia arterial aguda de miembros inferiores.
- Disfunción eréctil: Es la principal causa de impotencia en personas mayores de 40 años.

- Colitis isquémica, es un área de inflamación (irritación e hinchazón) causada por interferencia con el flujo sanguíneo al colon (intestino grueso), en las arterias de los intestinos.
- Aneurisma de aorta, con su máxima gravedad en la disección de aorta.

5

En una realización preferida, dicha patología caracterizada por un aumento de expresión de TLR-4 y/o un aumento de activación de TLR-4 es esclerosis múltiple. El término “esclerosis múltiple”, en el contexto de la presente invención, se refiere a una patología caracterizada por la aparición de lesiones desmielinizantes, neurodegenerativas y crónicas del sistema nervioso central. Actualmente se desconocen las causas que la producen aunque se ha demostrado la implicación de diversos mecanismos autoinmunes. En pacientes de esclerosis múltiple, los linfocitos cruzan la barrera hematoencefálica para atacar a la mielina, mientras que aparece un proceso inflamatorio facilitado por macrófagos y células de neuroglía.

10

15

En una realización preferida, dicha patología caracterizada por un aumento de expresión de TLR-4 y/o un aumento de activación de TLR-4 es artritis reumatoide. El término “artritis reumatoide”, en el contexto de la presente invención, se refiere a una patología inflamatoria sistémica autoinmune, caracterizada por provocar una sinovitis persistente de las articulaciones, produciendo su destrucción progresiva generando distintos grados de deformidad e incapacidad funcional. El proceso se inicia con la intervención de factores humorales y celulares, particularmente linfocitos T CD4, que generan moléculas mediadoras de la inflamación, atraen y activan células de la sangre periférica, produciendo proliferación y activación de los sinoviocitos, invadiendo y destruyendo el cartílago articular, el hueso subcondral, tendones y ligamentos.

20

25

En una realización preferida, dicha patología caracterizada por un aumento de expresión de TLR-4 y/o un aumento de activación de TLR-4 es una drogadicción. El término “drogadicción” o “drogodependencia” o “farmacodependencia”, en el contexto de la presente invención, se refiere a un trastorno o patología causada por el frecuente uso de sustancias adictivas llamadas drogas o fármacos. Según el CIE-10 (Organización Mundial de la Salud, 2005) para poder ser diagnosticada como tal, la drogodependencia ha de presentar tres o más de los siguientes criterios, que hacen referencia tanto a aspectos relacionados con la dependencia física como con la psicológica, en un periodo de 12 meses:

30

35

- fuerte deseo de consumir la sustancia (en inglés *craving*),
- dificultades para controlar dicho consumo,

- síndrome de abstinencia al interrumpir o reducir el consumo,
- tolerancia,
- abandono progresivo de intereses ajenos al consumo de la sustancia,
- inversión cada vez mayor de tiempo en actividades relacionadas con la obtención de la sustancia o con la recuperación de sus efectos,
- persistencia en el uso de la sustancia a pesar de percibir de forma clara sus efectos perjudiciales.

Para la administración a un sujeto de un aptámero de ácido nucleico con capacidad de unirse específicamente e inhibir a TLR-4 y que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 o una variante funcionalmente equivalente de las mismas, dicho aptámero se formulará en una composición farmacéutica adecuada. Los detalles de dicha composición farmacéutica se discuten a continuación.

B. Usos médicos del complejo de la invención

Los complejos de acuerdo a la presente invención que comprenden un aptámero de ácido nucleico con capacidad de unirse específicamente e inhibir a TLR-4 y que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 o una variante funcionalmente equivalente de las mismas y un grupo funcional de acuerdo a la invención pueden comprender, como grupo funcional, un fármaco adecuado para el tratamiento de una patología caracterizada por un aumento de expresión de TLR-4 y/o un aumento de activación de TLR-4. De esta forma se logra por tanto el doble objetivo de (i) inhibir la actividad de TLR-4 y (ii) dirigir el fármaco de manera específica a su lugar de acción.

Por lo tanto, en otro aspecto, la presente invención se refiere a un complejo que comprende un aptámero de ácido nucleico con capacidad de unirse específicamente e inhibir a TLR-4 y que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 o una variante funcionalmente equivalente de las mismas y un grupo funcional para su uso en medicina.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un complejo que comprende un aptámero de ácido nucleico con capacidad de unirse específicamente e inhibir a TLR-4 y que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 o una variante funcionalmente equivalente de las mismas y un grupo funcional para

su uso en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una patología caracterizada por un aumento de expresión de TLR-4 y/o un aumento de activación de TLR-4.

- 5 Alternativamente, se puede expresar como el uso de un complejo que comprende un aptámero de ácido nucleico con capacidad de unirse específicamente e inhibir a TLR-4 y que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 o una variante funcionalmente equivalente de las mismas y un grupo funcional para su uso en el tratamiento de una patología caracterizada por un aumento de expresión de TLR-4 y/o un aumento de activación de TLR-4.

- 15 Alternativamente, se puede expresar como método de tratamiento de una patología caracterizada por un aumento de expresión de TLR-4 y/o un aumento de activación de TLR-4 en un sujeto, que comprende la administración a dicho sujeto de una cantidad terapéuticamente efectiva de un complejo que comprende un aptámero de ácido nucleico con capacidad de unirse específicamente e inhibir a TLR-4 y que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 o una variante funcionalmente equivalente de las mismas y un grupo funcional a dicho sujeto.

- 20 De acuerdo con la invención, un complejo que comprende un aptámero de ácido nucleico con capacidad de unirse específicamente e inhibir a TLR-4 y que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 o una variante funcionalmente equivalente de las mismas y un fármaco se une específicamente a TLR-4 en la superficie de un célula diana. Al contactar el aptámero de la invención a TLR-4 inhibe su actividad, resultando en una reducción o interrupción en la liberación de citoquinas pro-inflamatorias tales como IL-1, IL-8, TNF-alfa e IL-12, y el fármaco ejerce su función sobre la célula o sobre el entorno donde se encuentra dicha célula.

- 30 Los términos “aptámero”, “complejo”, “grupo funcional”, “fármaco”, “tratamiento”, “cantidad terapéuticamente efectiva”, “sujeto”, “célula diana” y “patología caracterizada por un aumento de expresión de TLR-4 y/o un aumento de activación de TLR-4” han sido descritos en detalle anteriormente y sus definiciones y particularidades se incluyen aquí por referencia.

- 35 Fármacos adecuados que pueden ser usados como grupos funcionales en los complejos formados con un aptámero de ácido nucleico con capacidad de unirse específicamente e

inhibir a TLR-4 incluyen, sin limitación, antagonistas de TLR-4, tales como naloxona, naltrexona, LPS, idulilast, propentofilina, amitriptilina, quetotifeno, ciclobenzaprina, mianserina e imipramina; antiagregantes plaquetarios, tales como aspirina y clopidogrel; anti-coagulantes, tales como heparina, acenocumarol, warfarina, dabigatrán y rivaroxaban; y
 5 antioxidantes, tales como edaravona; el activador tisular del plasminógeno y sus variantes recombinantes; ácidos nucleicos que posean la capacidad de silenciar la expresión de genes implicados en una patología caracterizada por un aumento de expresión de TLR-4 y/o un aumento de activación de TLR-4, tales como ARN antisentido, ADN antisentido y ARN pequeños de interferencia; péptidos, tales como péptidos de señalización y péptidos de
 10 unión a diana.

Composiciones farmacéuticas

Para la administración a un sujeto en necesidad del mismo de un aptámero de ácido
 15 nucleico con capacidad de unirse específicamente e inhibir a TLR-4 y que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 o una variante funcionalmente equivalente de las mismas, o un complejo que comprende un aptámero de ácido nucleico con capacidad de unirse específicamente e inhibir a TLR-4 y que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1 y
 20 SEQ ID NO: 2 o una variante funcionalmente equivalente de las mismas y un grupo funcional, dichos aptámeros y complejos se pueden formular en composiciones farmacéuticas adecuadas.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica, en
 25 adelante “la primera composición farmacéutica de la invención”, que comprende al menos un aptámero de ácido nucleico con capacidad de unirse específicamente e inhibir a TLR-4 y que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 o una variante funcionalmente equivalente de las mismas.

30 En una realización particular, la primera composición farmacéutica de la invención comprende además uno o más soportes, excipientes, o solventes farmacéuticamente aceptables.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica, en
 35 adelante “la segunda composición farmacéutica de la invención”, que comprende al menos un complejo que comprende un aptámero de ácido nucleico con capacidad de unirse

específicamente e inhibir a TLR-4 y que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 o una variante funcionalmente equivalente de las mismas y un grupo funcional.

- 5 En una realización particular, la segunda composición farmacéutica de la invención comprende además uno o más soportes, excipientes, o solventes farmacéuticamente aceptables.

- 10 Las composiciones farmacéuticas proporcionadas por la presente invención pueden administrarse a un sujeto para el tratamiento de una patología caracterizada por un aumento de expresión de TLR-4 y/o un aumento de activación de TLR-4.

- 15 Los términos "aptámero", "complejo", "grupo funcional", "fármaco", "tratamiento", "sujeto" y "patología caracterizada por un aumento de expresión de TLR-4 y/o un aumento de activación de TLR-4" han sido descritos en detalle anteriormente y sus definiciones y particularidades se incluyen aquí por referencia.

- 20 El término "soporte farmacéuticamente aceptable" o "excipiente farmacéuticamente aceptable" o "solvente farmacéuticamente aceptable", en el contexto de la presente invención, pretende incluir cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes retardantes de la absorción e isotónicos, y similares, compatibles con la administración farmacéutica. El uso de tales soportes y vehículos en sustancias farmacéuticamente activas es bien conocido en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier soporte convencional es incompatible con el
25 compuesto activo, se contempla su uso en las composiciones de la invención. Los vehículos aceptables, excipientes, o estabilizadores aceptables no son tóxicos para el sujeto a las dosis y concentraciones empleadas, e incluyen tampones tales como fosfato, citrato, y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencil amonio, cloruro de hexametonio, cloruro de
30 benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, butilo o alcohol bencílico; alquil parabenos tales como metil o propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol, y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 aminoácidos); proteínas, tales como albúmina de suero, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina,
35 histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos, y otros carbohidratos incluyendo la glucosa, manosa, o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como

sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contra-iones formadores de sales tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos de Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEENTM, PLURONICSTM o polietilenglicol (PEG).

5 También se pueden incorporar en la composición farmacéutica proporcionada por la presente invención compuestos activos suplementarios. Por lo tanto, en una realización particular, la composición farmacéutica proporcionada por la presente invención puede también contener más de un compuesto activo según sea necesario para la indicación particular que se trata, preferentemente aquellos con actividades complementarias que no
10 afectan de manera adversa entre sí. Por ejemplo, puede ser deseable proporcionar además un agente quimioterapéutico, una citoquina, un agente analgésico, un agente anti-inflamatorio o un agente inmunosupresor. La cantidad eficaz de dichos otros agentes activos depende, entre otras cosas, de la cantidad terapéutica de los aptámeros o de los complejos que están presentes en la composición farmacéutica, la naturaleza y la gravedad de la
15 patología a tratar, el sujeto, etc.

En una forma de realización, el aptámero de ácido nucleico con capacidad de unirse específicamente e inhibir a TLR-4 y que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 o una variante funcionalmente equivalente
20 de las mismas, o el complejo de la invención, se formulan con vehículos que protegerán dichos productos frente a una eliminación rápida del cuerpo, tales como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes y sistemas de suministro microencapsulados. Se pueden utilizar polímeros biodegradables y biocompatibles, tales como etileno-acetato de vinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres, y ácido poliláctico. Los
25 métodos para la preparación de tales formulaciones serán evidentes para los expertos en la técnica. Estos se pueden preparar de acuerdo con métodos conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, como se describe en EE.UU. 4522, 811.

Las composiciones farmacéuticas proporcionadas por la presente invención pueden ser
30 administradas a un sujeto mediante cualquier ruta de administración adecuada, como por ejemplo por vía parenteral.

El término "parenteral", en el contexto de la presente invención, incluye la administración intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, o subcutánea. La forma intravenosa de
35 administración parenteral es generalmente preferida.

Además, las composiciones farmacéuticas proporcionadas por la presente invención se pueden administrar de forma adecuada por infusión de pulsos, por ejemplo, con dosis decrecientes del aptámero o del complejo de la invención. Preferiblemente, la dosificación se proporciona mediante inyecciones, más preferiblemente inyecciones intravenosas o subcutáneas, dependiendo en parte de si la administración es breve o crónica.

En otra realización particular, las composiciones farmacéuticas proporcionadas por la presente invención se pueden adaptar para la administración parenteral con la adición de soluciones estériles, suspensiones o productos liofilizados en la forma de dosificación adecuada. Las composiciones farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones acuosas estériles o dispersiones o polvos estériles para la preparación de soluciones o dispersiones inyectables estériles. Para la administración intravenosa, los vehículos adecuados incluyen solución salina fisiológica, agua bacteriostática CremophorEM (BASF, Parsippany, NJ) o tampón fosfato salino (PBS). En todos los casos, la composición debe ser estéril y fluida para facilitar la inyectabilidad. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe conservarse frente a la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos. El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, un poliol farmacéuticamente aceptable como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol líquido, y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y por el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de microorganismos puede lograrse mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal, y similares. En muchos casos, será preferible incluir en la composición agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol, y cloruro de sodio. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede provocarse incluyendo en la composición un agente que retrase la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y/o gelatina.

Las soluciones inyectables estériles pueden prepararse incorporando la cantidad requerida del compuesto activo (por ejemplo, un aptámero o complejo de la invención) en un disolvente apropiado con uno o una combinación de los ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de esterilización por filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los

enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son el secado al vacío y el secado por congelación que produce un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado a partir de una solución previamente filtrada estéril del mismo.

5

En una realización particular, dicha composición farmacéutica se administra a través de vía intravenosa. Excipientes adecuados pueden ser utilizados, tales como agentes de carga, agentes tamponantes o tensioactivos. Las formulaciones mencionadas se prepararán usando métodos estándar tales como los descritos o contemplados en las farmacopeas española y estadounidense y textos de referencia similares.

10

Es especialmente ventajoso formular las composiciones farmacéuticas, a saber, las composiciones parenterales, en forma de unidad de dosificación para facilitar la administración y uniformidad de dosificación. Forma de unidad de dosificación como se usa en el presente documento se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para el sujeto a tratar; conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de compuesto activo (un aptámero o complejo de la invención) calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico requerido. La especificación para las formas unitarias de dosificación de la invención están dictadas por y dependen directamente de las características únicas del compuesto activo y el efecto terapéutico particular a conseguir, y las limitaciones inherentes en la técnica de composición de tal compuesto activo para el tratamiento de sujetos.

15

20

Los compuestos activos (aptámero o complejo de la invención) se administrarán típicamente una o más veces al día, por ejemplo 1, 2, 3 o 4 veces diarias, con dosis diarias totales típicas en el intervalo de 0,0001 a 1,000 mg/kg de peso corporal/día, preferiblemente de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal/día, más preferiblemente de aproximadamente 0,01 a 10 mg/kg de peso corporal/día. Las composiciones farmacéuticas se pueden formular con el fin de contener la cantidad deseada, tal como una cantidad terapéuticamente eficaz del aptámero o complejo de la invención.

25

30

Las composiciones farmacéuticas proporcionadas por la presente invención se pueden incluir en un recipiente, envase, o dispensador junto con instrucciones para su administración.

35

La invención se describe a continuación por medio de los siguientes ejemplos que son meramente ilustrativos y de ninguna manera limitantes para el alcance de la invención.

EJEMPLOS

5

Materiales y métodos

Librería de aptámeros

Los inventores utilizaron la librería de aptámeros RND40 para llevar a cabo la selección de aptámeros específicos frente a TLR-4, suministrada por IBA GmbH (Goettingen, Alemania). La librería inicial RND40 está teóricamente constituida por 10^{24} oligonucleótidos de ADN de cadena sencilla (ssADN) con secuencia fijas en los extremos, de 18 nucleótidos cada una donde hibridan los cebadores respectivos para su amplificación por PCR, y una región central de 40 bases de secuencia aleatoria. En las selecciones realizadas se han utilizado 10^{13} oligonucleótidos de esta librería.

15

6HIS-hTLR-4 recombinante

La proteína correspondiente al dominio extracelular de la proteína TLR-4 humana, aminoácidos 24-631, se generó de manera recombinante fusionada a una etiqueta de 6 histidinas en el extremo C-terminal, mediante expresión en baculovirus.

20

Células

Las células HEK293T y HEK293T/TLR-4 se obtuvieron de Invivogen (San Diego, California, USA).

25

Selección con células HEK-293T-TLR4 / HEK-293T.

Para cada ronda de selección, se sembraron $8-10 \times 10^5$ células HEK-293T por triplicado en pocillos de placa P6, 24 h antes del ensayo de selección y se incubaron a 37°C , 5% CO_2 . A continuación, se añadió 1 nmol de aptámeros de la librería RND40 (o de la población aislada en la ronda de selección anterior) en 100 μl PBS, previamente desnaturalizados a 95°C durante 10 min seguidos de una incubación a 4°C durante 10 min, se añadió 300 μl de medio DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) suplementado con 10% suero bovino fetal, 100 U/ml penicilina, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ estreptomicina y 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ amfotericina y se aplicaron sobre las células. Tras 1 h de incubación a 37°C , 5% CO_2 , se retiró el medio de cultivo con los aptámeros no unidos, se lavaron las células 2 veces con PBS y se recuperaron en 500 μl de PBS mediante centrifugación a 1500 rpm. Las células se centrifugaron para retirar el

35

sobrenadante y se los aptámeros pegados a las células fueron amplificados por PCR para preparar suficiente cantidad para la siguiente ronda de selección.

La contra-selección sobre células HEK-293T de la librería de aptámeros RND40 se realizó en la preparación previa de la población RND40 inicial y cada 3 rondas de selección, con la población aislada de la ronda de selección anterior. Para ello, se sembraron $8-10 \times 10^5$ células HEK-293T por triplicado en pocillos de placa P6, 24 h antes del ensayo de selección y se incubaron a 37°C, 5% CO₂. A continuación, se añadió 1 nmol de aptámeros de la librería RND40 (o de la población aislada en la ronda de selección anterior) en 100 µl PBS, previamente desnaturalizados a 95°C durante 10 min seguidos de una incubación a 4°C durante 10 min, se añadió 300 µl de medio DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) suplementado con 10% suero bovino fetal, 100 U/ml penicilina, 100 µg/ml estreptomicina y 25 µg/ml amfotericina y se aplicaron sobre las células. Tras 1 h de incubación a 37°C, 5% CO₂, se retiró el medio de cultivo con los aptámeros no unidos para ser utilizados en rondas de selección sobre TLR-4.

Selección con proteína soluble hTLR-4

Para cada ronda de selección, se utiliza la librería RND40 enriquecida en una ronda de selección anterior. Se incubó 1 nmol de aptámeros con 7 µg de 6xHIS-hTLR-4 (en una relación de 10 moléculas de aptámero por 1 molécula hTLR-4), en buffer de aptámeros (20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1 mM MgCl₂, 150 mM NaCl, 5 mM KCl), a 37°C durante 1 h con agitación. Posteriormente, se añadió la resina NTA-Ni (QIAGEN, Alemania) y se incubó a 4°C durante 1 h para capturar la proteína. Tras 3 lavados con buffer de aptámeros, se amplificaron las secuencias unidas por PCR para preparar suficiente cantidad para la siguiente ronda de selección.

La contraselección se realiza en las mismas condiciones que la selección pero en ausencia de proteína TLR-4 unida a la resina.

Amplificación de los aptámeros seleccionados.

Los aptámeros seleccionados fueron resuspendidos en un volumen de 20 µl de agua destilada y se amplificaron mediante PCR usando los cebadores, que se corresponderán con las secuencias SEQ ID NO: 5 (GCGGATGAAGACTGGTGT) y SEQ ID NO: 6 (GTTGCTCGTATTTAGGGC) en las condiciones de 0.8 µM/cebador SEQ ID NO: 5, 0.8 µM/cebador SEQ ID NO: 6, 200 mM dNTPs, 2 mM MgCl₂, 10 U Taq polimerasa (Biotools,

España) en un volumen final de 200 µl siguiendo el siguiente programa de amplificación: 2 min a 95°C; 15 ciclos de 30 s a 95°C, 30 s a 56°C y 30 s a 72°C; y finalmente 5 min a 72°C.

ELONA

- 5 Se determinó si los aptámeros seleccionados reconocían la proteína TLR-4. Para ello, se añadieron 100 ng/pocillo de 6xHIS-TLR-4 recombinante a una placa de microtitulación de 96 pocillos y se incubaron a 4°C durante 16 h. Posteriormente, aptámeros individuales marcados con digoxigenina en su extremo 5', fueron diluidos a una concentración 5 µg/mL y luego desnaturalizados durante 10 min a 95°C y enfriados durante 10 min en hielo.
- 10 Después, 20 pmoles de cada uno de los aptámeros en 100 µl (200 nM) de tampón de aptámeros fueron añadidos a cada pocillo y la placa fue incubada durante 1 h a 37°C. Por último, la placa fue incubada con anticuerpos anti-digoxigenina conjugados con peroxidasa y revelada usando ABTS. Como control positivo se utilizó un aptámero de ADN frente a Li H2A (Martín et al., 2013, PLoS ONE 8: e78886).

15

Ensayos de unión de los aptámeros a hTLR-4 recombinante

- Con objeto de analizar la capacidad de cada uno de los aptámeros identificados de unirse a hTLR-4, se realizaron experimentos en los que hTLR-4 fue unido a una resina Ni-NTA previamente equilibrada, a través de la etiqueta de histidinas. A continuación, los complejos
- 20 resina:proteína conteniendo 1 pmol de TLR4 fueron incubados con 1 pmol de los aptámeros TLRApt#1R (SEQ ID NO: 3), TLRApt#2F, TLRApt#3R y TLRApt#4F (SEQ ID NO: 4) previamente estructurados mediante desnaturalización térmica a 95°C durante 10 min y posterior renaturalización a 4°C durante 10 min. Después de incubar durante 10 min a 37°C, se lavaron los complejos y se recuperaron los aptámeros con 150 mM imidazol disuelto en
- 25 PBS con 1 mM MgCl₂. Los valores de aptámero unido a hTLR-4 se determinaron mediante PCR cuantitativa (qPCR) usando los cebadores con las secuencias SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6 en un termociclador IQ5 (BioRad).

Ensayos de unión de los aptámeros a TLR-4 expresado en células

- 30 Con objeto de analizar la capacidad de los aptámeros identificados de unirse a la proteína TLR-4 expresada en células HEK-293, se añadieron 20 pmoles de cada uno de los aptámeros TLRApt#1R (SEQ ID NO: 3), TLRApt#2F, TLRApt#3R y TLRApt#4F (SEQ ID NO: 4) sobre un cultivo de células HEK-293-TLR4 sembradas a 20,000 células/pocillo en placas de microtitulación de 96 pocillos a una densidad de 2×10^4 cel/pocillo, 2 días antes del inicio
- 35 del ensayo. Después de incubar durante 30 min a 37°C, 5% CO₂, las células se lavaron, se

recuperaron los aptámeros con 150 mM imidazol disuelto en PBS con 1 mM MgCl₂, y se llevó a cabo qPCR para determinar los valores de Ct.

Ensayos de actividad frente al receptor hTLR-4.

5 Para realizar estos ensayos, se utilizaron células HEK-Blue hTLR4 (Invivogen, ref. hkb-hltr4), que expresan el receptor TLR-4 humano, junto con las proteínas MD2 y CD14, las cuales se activan por la unión de su agonista, lipopolisacárido de *Escherichia coli* K12 (LPS-EK). Para detectar la activación de TLR-4, esta línea celular contiene un gen reportero SEAP (fosfatasa alcalina embrionaria secretada, en inglés “*secreted embryonic alkaline*
10 *phosphatase*”) que está controlado por el promotor NF-κB, de modo que se expresa en respuesta a esta vía de señalización NF-κB, inducida por TLR-4. La enzima SEAP es secretada al medio de cultivo, y al añadir y metabolizar su sustrato comercial QUANTI-Blue™ (Invivogen, San Diego, California, USA) provoca un cambio de color del medio de rojo a azul. Por otra parte, la molécula agonista control LPS-EK UP (lipopolysaccharide de *E.*
15 *coli* K12 Ultra Puro) y el antagonista LPS-RS UP (Lipopolysaccharide de *R. sphaeroides* Ultra Puro) se disuelven en 1mM MgCl₂ en PBS estéril a concentraciones de 0.02 ng/μL y 2 ng/μL, respectivamente. Los aptámeros se preparan a concentraciones de 0.1, 1, 10 y 100 ng/μL en 1mM Cl₂Mg en PBS estéril, se desnaturalizan a 95°C durante 10 min y se estructuraron a 4°C durante 10 min.

20 Para el ensayo, se sembraron células HEK-Blue hTLR4 en placas de microtitulación de 96 pocillos a una densidad de 2×10^4 cel/pocillo, 3 días antes del inicio del ensayo en un volumen total de 200 μl de medio DMEM suplementado con 10% suero bovino fetal, 100 U/ml penicilina, 100 μg/ml estreptomicina y 25 μg/ml amfotericina. A continuación, se
25 añadieron 20 μl del agonista control LPS-EK-UP (0.02 ng/μl). Tras 1 h de incubación a 37°C, se añadieron 10 μl/pocillo de cada concentración de aptámeros (Concentraciones finales de 0.2, 2, 20 y 200 nM o el antagonista control LPS-RS-UP (2 ng/μl; 20 ng). La activación del receptor hTLR4 se midió 24 h después utilizando 20 μl del medio de cultivo al que se añaden 100 μl de disolución Quanta-Blue a temperatura ambiente. El cambio de color del
30 medio se mide por absorbancia a 630 nm.

Modelo animal de ictus

Se utilizaron ratones machos adultos C57BL que pesaban 28 a 30 g. C57BL/10ScNJ (antiguo nombre C57BL/10ScCr), y los ratones C57BL/10ScSn fueron adquiridos de The
35 Jackson Laboratory (Bar Harbor, Me, USA). La cepa murina C57BL/10ScNJ no expresa TLR4 funcional por delección del gen *TLR4*, y la cepa C57BL/10ScSn no expresa ninguna

mutación en el gen *TLR4* y es empleada como grupo control. Se utilizaron 4 ratones deficientes en *TLR4* por grupo (C57BL/10ScNJ) y 4 ratones control por grupo (C57BL/10ScSn). Todos los protocolos experimentales se ajustaron a las directrices del Comité de Bienestar Animal de la Universidad Complutense (siguiendo las directivas europeas 86/609/CEE y 32/2007/CE). Los animales se han alojado en condiciones normales de temperatura, humedad y ciclos de luz/oscuridad de 12 horas con libre acceso a comida y agua.

La inducción de la isquemia focal cerebral se ha llevado a cabo mediante la oclusión de la arteria cerebral media (en inglés “*median cerebral arterial occlusion*”, MCAO) según las enseñanzas de Caso et al., 2007 (Caso et al., 2007, *Circulation* 115:1599-608). Brevemente, se induce una isquemia cerebral focal permanente por ligadura de la arteria carótida común (ACC) y oclusión de la arteria cerebral media distal ipsilateral (ACM). Para la ligadura de la ACC, se hace una incisión ventral-cervical para aislar dicha arteria y ocluirla de forma permanente con ligadura. Para la oclusión de la ACM, se hace una incisión a 1 cm de la línea perpendicular que une el cantus lateral del ojo izquierdo y el canal auditivo externo y se retira el músculo temporal. Se hace un trepano para exponer la ACM que se ocluye por ligadura. Después de la cirugía, el cierre de las incisiones y la desinfección, los animales son devueltos a sus jaulas con acceso libre de agua y comida. Durante la cirugía se controlan las constantes del animal.

El daño cerebral se evaluó mediante imagen por Resonancia Magnética. Brevemente, los ratones fueron anestesiados con isoflurano y 24 horas después de MCAO, el tamaño del infarto se ha evaluado por MRI. Las imágenes resaltadas en T2 (T2WI) han sido adquiridas en un BIOSPEC BMT 47/40 operando a 4.7 T (Bruker-Medical, Ettlingen, Germany; MRI Unit, Instituto Pluridisciplinar, UCM).

EJEMPLO 1: Selección de aptámeros específicos frente a TLR-4

Los inventores utilizaron la librería de aptámeros RND40 para llevar a cabo la selección de aptámeros específicos frente a TLR-4 suministrada por IBA GmbH (Goettingen, Alemania). La librería inicial RND40 está constituida por oligonucleótidos (ssADN) con secuencia fijas en los extremos, de 18 nucleótidos cada una donde hibridan los cebadores respectivos para su amplificación por PCR, y una región central de 40 bases de secuencia aleatoria.

La librería inicial RND40 de 10^{13} aptámeros fue enriquecida en aptámeros específicos frente a hTLR-4. Como paso previo a la selección con TLR-4, se realizó un proceso de “contra-selección” de la librería frente a la superficie o matriz donde se presenta la molécula diana (resina magnética, células de la misma línea que la que expresa la proteína diana, etc.).

5

EJEMPLO 2: Caracterización de los aptámeros seleccionados

Se identificaron los aptámeros seleccionados después de 6 rondas de selección siguiendo las siguientes estrategias:

- 10 a) Mediante clonación de la población de aptámeros en un plásmido con objeto de obtener aptámeros individuales, y posterior secuenciación Sanger.
- b) Mediante secuenciación masiva de la población de aptámeros obtenida, identificándose los aptámeros que aparecen más repetidos.

15 Las secuencias más representadas se sintetizaron químicamente por IBA GmbH (Goettingen, Alemania) y se estudió la afinidad y la actividad de cada uno de los aptámeros en ensayos de unión a proteína recombinante hTLR-4 o a células HEK-293-TLR-4, mediante ELONA, ensayos de unión de los aptámeros a la proteína TLR-4 recombinante y a TLR-4 expresado en células, ensayos de actividad frente al receptor hTLR-4

20

Los resultados de los ensayos de ELONA (Fig. 1) ponen de manifiesto que los aptámeros que se unen de forma más eficiente a la proteína hTLR-4 recombinante son los aptámeros TLRApt#1R (SEQ ID NO: 3) y TLRApt#4F (SEQ ID NO: 4). Mediante el mismo tipo de ensayo, se identificaron los aptámeros TLRApt#2F y TLRApt#3R. En la Figura 2 se

25 muestran las secuencias y estructuras secundarias más probables de los aptámeros TLRApt#1R (SEQ ID NO: 3) y TLRApt#4F (SEQ ID NO: 4) seleccionados, obtenidas utilizando el software mFold (Zuker M., 2003, Nucleic Acids Res 31:3406-15).

La capacidad de unión de los aptámeros a hTLR-4 se determinó mediante incubación de los

30 aptámeros con una resina de Ni-NTA con hTLR-4 unido, recuperación y posterior amplificación por qPCR de los aptámeros unidos. Los resultados obtenidos muestran que todos los aptámeros seleccionados son capaces de unirse a la proteína hTLR-4 recombinante (Fig. 3A). En estos experimentos, un valor de Ct menor indica una mayor cantidad de aptámero unido a hTLR-4.

35

Con objeto de analizar la capacidad de los aptámeros identificados de unirse a la proteína TLR4 expresada en células HEK-293, 20 pmol (500 ng) de los aptámeros TLRApt#1R (SEQ ID NO: 3), TLRApt#2F, TLRApt#3R y TLRApt#4F (SEQ ID NO: 4) se añaden a un cultivo de células HEK-293-TLR4. Después de incubar durante 30 min, a 37°C, 5% CO₂, se lavan las células, se recuperan y se hace qPCR con objeto de calcular los valores de Ct. En estos experimentos, un valor de Ct menor indica una mayor cantidad de aptámero unido a las células. Los resultados obtenidos muestran que los aptámeros seleccionados TLRApt#1R (SEQ ID NO: 3) y TLRApt#4F (SEQ ID NO: 4) (Fig. 3B) son los que se unen con mayor afinidad.

Posteriormente, se efectuaron ensayos de actividad frente al receptor hTLR-4 para determinar si los aptámeros seleccionados son capaces de afectar positiva (actividad agonista) o negativamente (actividad antagonista) la actividad del receptor TLR-4. Los resultados muestran que los aptámeros TLRApt#1R (SEQ ID NO: 3), TLRApt#2F, TLRApt#3R y TLRApt#4F (SEQ ID NO: 4) y tienen actividad antagonista *in vitro* (Fig. 4A).

A la vista de estos resultados, se realizaron curvas dosis-respuesta con objeto de determinar la concentración de cada aptámero a la que se obtiene el máximo efecto antagonista. A partir de los resultados obtenidos (Fig. 4B) se puede concluir que las concentraciones a las que se observa el mejor efecto son 20 nM para TLRApt#1R (SEQ ID NO: 3) y 200 nM para TLRApt#4F (SEQ ID NO: 4). Significancia estadística: *, P<0.05; **, P<0.01; ***, P<0.001.

EJEMPLO 3: Optimización de los aptámeros antagonistas de TLR-4 para incrementar su actividad y estabilidad en modelos animales

Los aptámeros que han mostrado capacidad de inhibir el receptor TLR-4 han sido modificados mediante la eliminación de regiones concretas de su secuencia, con objeto de aumentar su estabilidad y/o resistencia a nucleasas. Para ello, se ha realizado un estudio de la estructura secundaria de los diferentes aptámeros utilizando el programa mFold (Zuker M., 2003, citado *at supra*) y se ha analizado la capacidad de los aptámeros de formar estructuras G-quadruplex mediante el programa QGRS Mapper (Kikin et al., 2006, Nucleic Acids Res 34:W676-W682). De esta manera, se diseñaron y sintetizaron los aptámeros TLRApt#1R-T (SEQ ID NO: 1) y TLRApt#4F-T (SEQ ID NO: 2), correspondientes a los identificados en las primeras selecciones (Fig. 5).

EJEMPLO 4: Efecto de los aptámeros antagonistas de TLR-4 en un modelo animal de ictus

Se estudió la capacidad de los nuevos aptámeros optimizados para bloquear la respuesta inflamatoria producida tras un episodio de ictus en un modelo animal de ictus, evaluando la capacidad de los aptámeros específicos de TLR-4 para disminuir la lesión cerebral.

Para ello, se utilizaron ratones macho adultos deficientes en TLR-4 (C57BL/10ScNJ) y ratones control que expresan TLR-4 (C57BL/10ScSn), en los que se indujo isquemia focal cerebral mediante la oclusión de la arteria cerebral media (MCAO). Los resultados obtenidos en los ratones que expresan de forma normal el TLR4 (ratones control) demuestran que los aptámeros producen una disminución de tamaño de la zona infartada que, en el caso del aptámero TLRApt#4F-T (SEQ ID NO: 2) es estadísticamente significativa. Por otra parte, los resultados obtenidos en ratones deficientes en TLR-4 muestran que no existe efecto del aptámero TLRApt#4F-T (SEQ ID NO: 2) sobre el que se obtiene cuando los ratones se tratan con el vehículo (Fig. 6). Este dato indica claramente que el efecto del aptámero TLRApt#4F-T (SEQ ID NO: 2) se produce a través de TLR-4.

Conclusiones

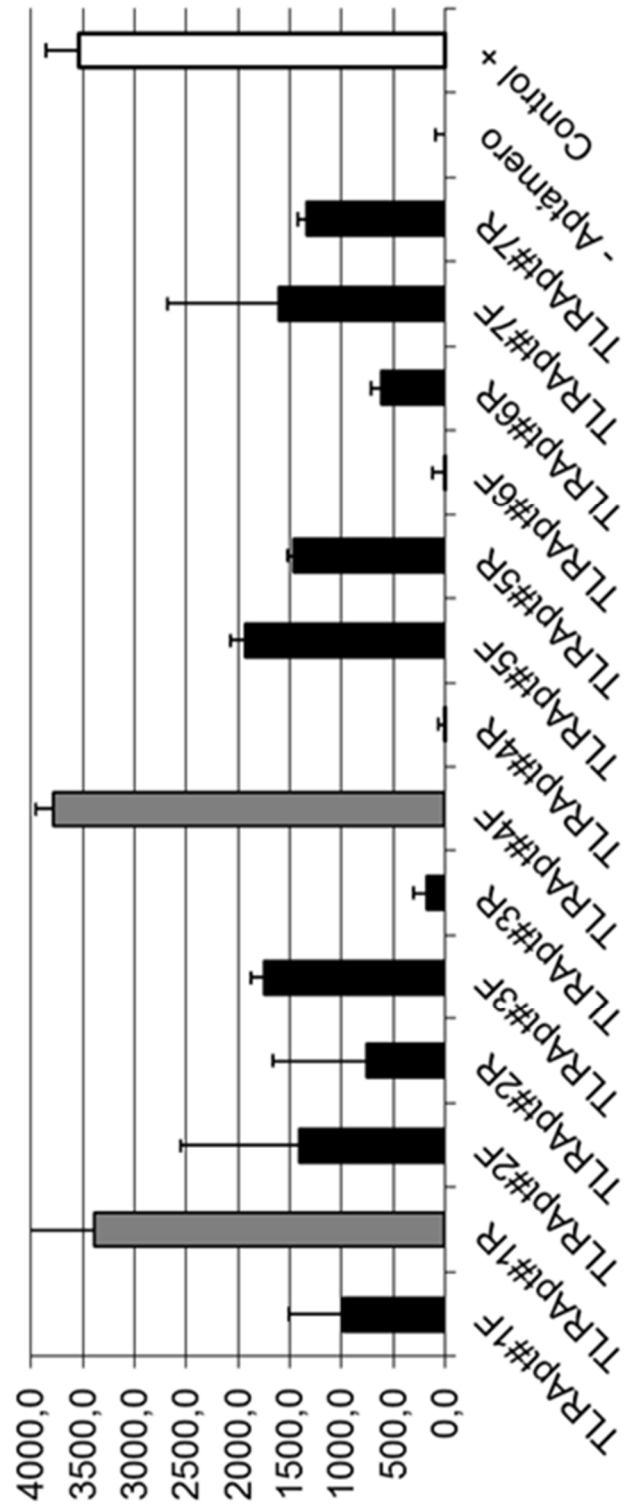
- Se han seleccionado los aptámeros TLRApt#1R (SEQ ID NO: 3) y TLRApt#4F (SEQ ID NO: 4) frente al dominio extracelular del receptor TLR-4, que reconocen el receptor TLR-4 humano, tanto en su forma recombinante soluble (*in vitro*), como integrado en la membrana de células HEK293 (*in vivo*).
- Los aptámeros TLRApt#1R (SEQ ID NO: 3) y TLRApt#4F (SEQ ID NO: 4) muestran un efecto antagonista del receptor TLR-4.
- Se han obtenido aptámeros truncados TLRApt#1R-T (SEQ ID NO: 1) y TLRApt#4F-T (SEQ ID NO: 2) que mantienen la actividad antagonista de los aptámeros originales TLRApt#1R (SEQ ID NO: 3) y TLRApt#4F (SEQ ID NO: 4), respectivamente.
- El aptámero TLRApt#4F-T (SEQ ID NO: 2) es capaz de reducir la zona infartada en un modelo animal de ictus.

REIVINDICACIONES

1. Un aptámero de ácido nucleico con capacidad de unirse específicamente e inhibir a TLR-4, y que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 o una variante funcionalmente equivalente de las mismas.
2. Aptámero según la reivindicación 1, en donde la secuencia se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4.
3. Aptámero según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en donde el ácido nucleico es ADN.
4. Aptámero según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el TLR-4 es un TLR-4 humano.
5. Un complejo que comprende el aptámero según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y un grupo funcional.
6. Complejo según la reivindicación 5, en donde el grupo funcional es un reactivo detectable.
7. Uso *in vitro* de un aptámero según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o un complejo según cualquiera de las reivindicaciones 5 o 6 para detectar TLR-4.
8. Uso según la reivindicación 7, en donde la detección de TLR-4 se realiza mediante un método seleccionado del grupo que consiste en ELONA, aptacitoquímica, aptahistoquímica y citometría de flujo.
9. Uso *in vitro* de un aptámero según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o un complejo según cualquiera de las reivindicaciones 5 o 6 para inhibir TLR-4.
10. Método *in vitro* para la detección de TLR-4 en una muestra que comprende
 - i) poner en contacto dicha muestra con un aptámero según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o un complejo según cualquiera de las reivindicaciones 5 o 6, y
 - ii) separar el aptámero o complejo no unido a TLR-4,

iii) detectar la presencia del aptámero o complejo unido al TLR-4 presente en la muestra.

- 5 11. Método según la reivindicación 10, en donde la detección se realiza por medio de fluorescencia.
- 10 12. Método *in vitro* para inhibir TLR-4 en una muestra que comprende poner en contacto una muestra que comprende TLR-4 con un aptámero según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o un complejo según cualquiera de las reivindicaciones 5 o 6, en condiciones adecuadas inhibir TLR-4.
13. Método según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, en donde la muestra es una muestra biológica de un sujeto.
- 15 14. Método según la reivindicación 13, en donde el sujeto es un humano.
- 20 15. Un aptámero según las reivindicaciones 1 a 4 o un complejo según cualquiera de las reivindicaciones 5 o 6 para su uso en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una patología caracterizada por un aumento de expresión de TLR-4 y/o un aumento de activación de TLR-4.
- 25 16. Aptámero o complejo para su uso según la reivindicación 15, en donde la patología caracterizada por un aumento de expresión y/o un aumento de activación de TLR-4 es ictus.
17. Una composición farmacéutica que comprende al menos un aptámero según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o al menos un complejo según cualquiera de las reivindicaciones 5 o 6, opcionalmente en combinación con uno o más soportes, excipientes o solventes farmacéuticamente aceptables.



U.A.

Figura 1

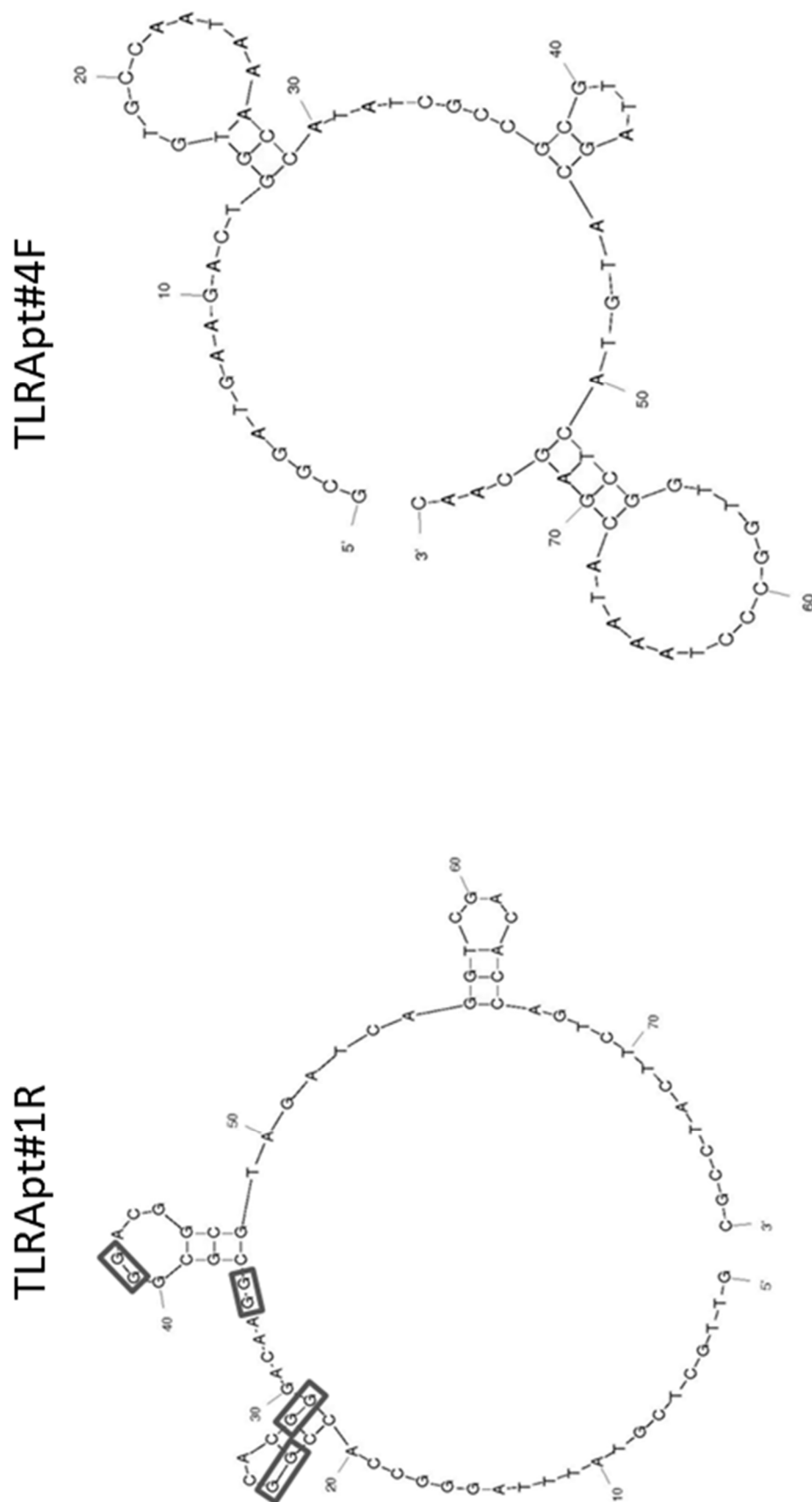
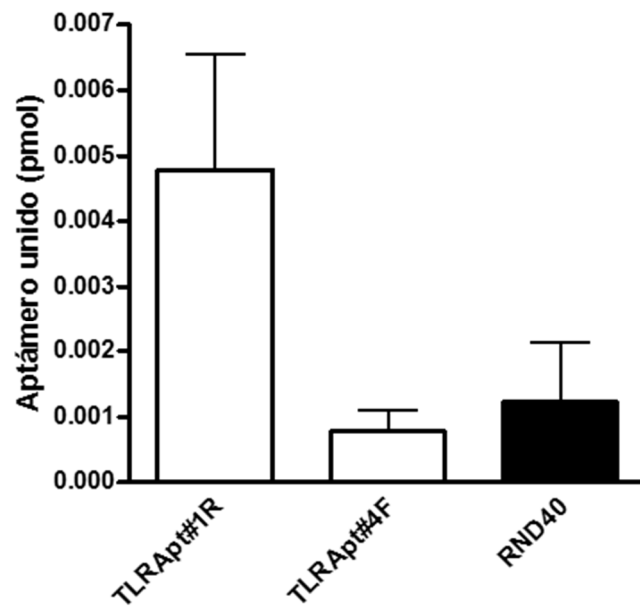


Figura 2

A



B

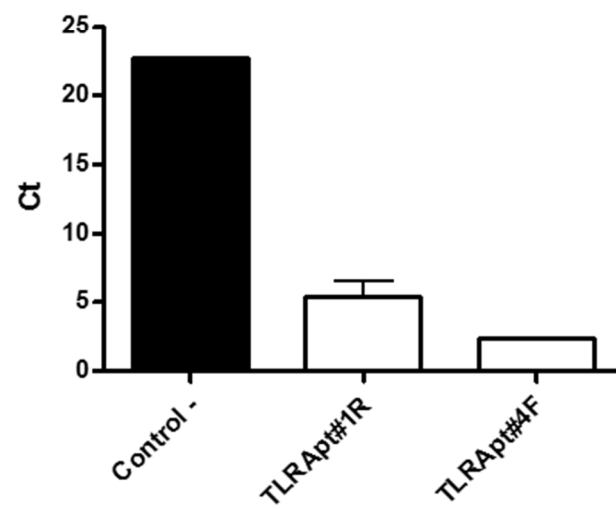
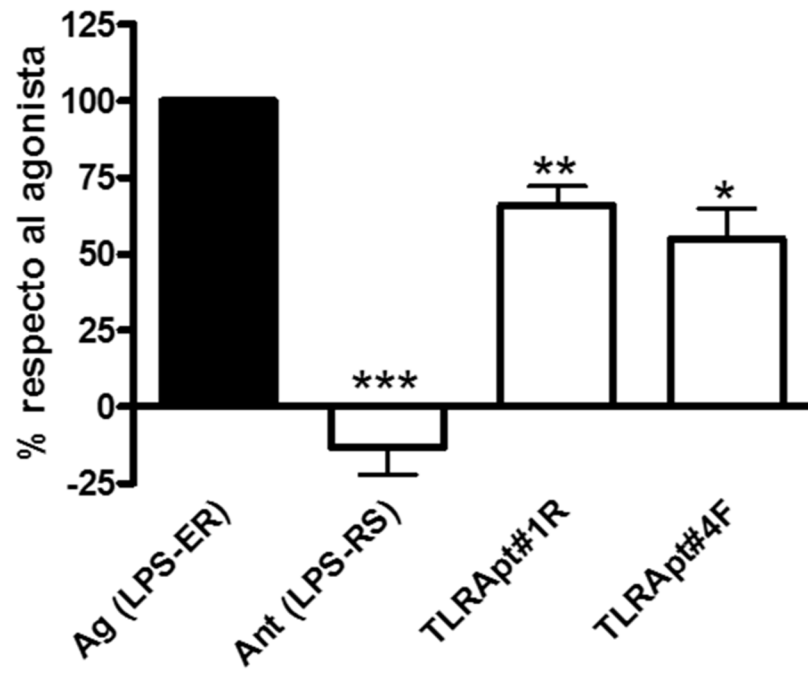


Figura 3

A



B

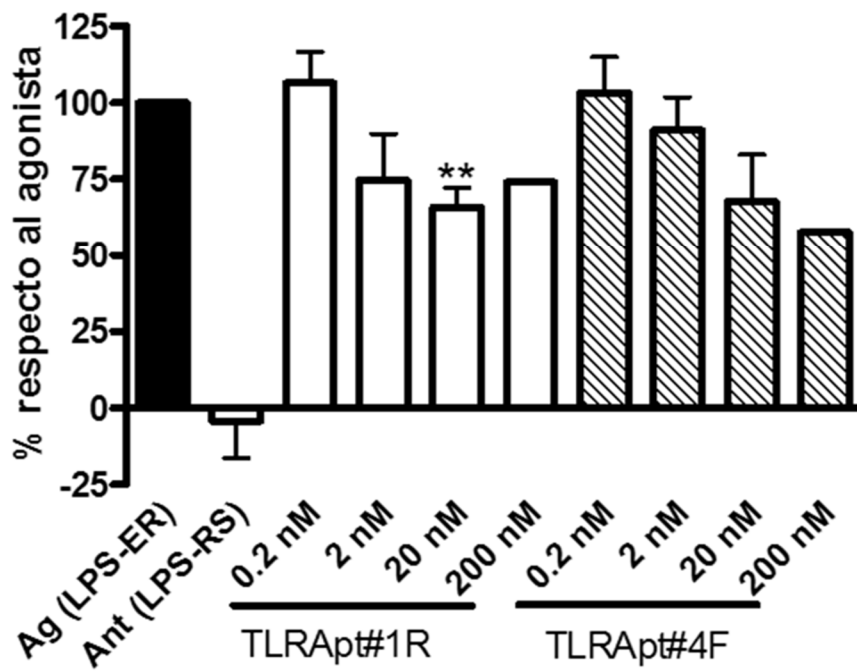
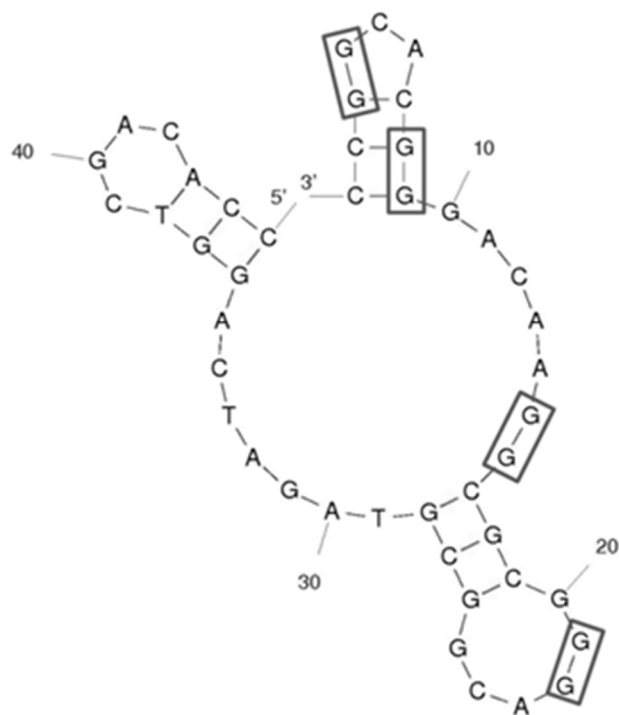


Figura 4

TLRApt#1R-T



TLRApt#4F-T

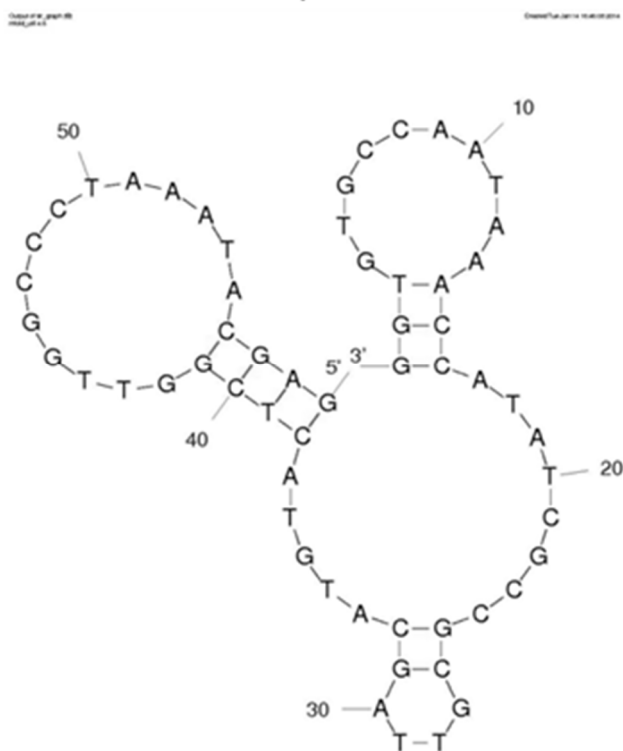


Figura 5

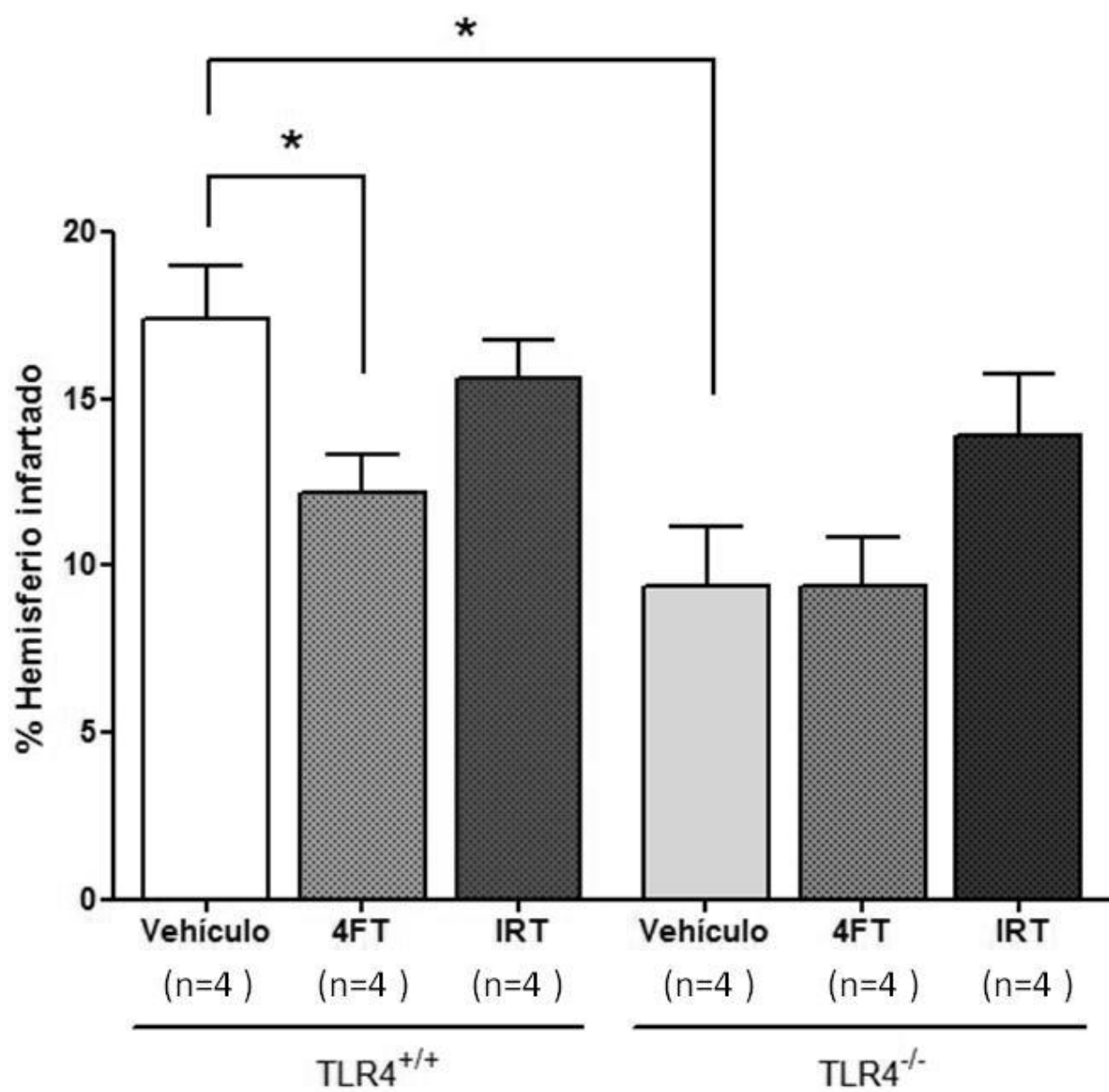


Figura 6

Listado de Secuencias

<110> APTUS BIOTECH, S.L.

<120> APTÁMEROS ESPECÍFICOS DE TLR-4 Y USOS DE LOS MISMOS

<130> P9923ES00

<160> 6

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Aptámero TLRApt#1R-T con capacidad de unirse específicamente e inhibir a TLR-4

<400> 1

ccggcacggg acaaggcgcg ggacggcgta gatcaggtcg acacc 45

<210> 2

<211> 59

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Aptámero TLRApt#4F-T con capacidad de unirse específicamente e inhibir a TLR-4

<400> 2

ggtgtgccaa taaaccatat cgccgcgtta gcatgtactc gggtggccct aaatacgag 59

<210> 3

<211> 78

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Aptámero TLRApt#1R con capacidad de unirse específicamente e inhibir a TLR-4

<400> 3

ggtgctcgta ttagggcca ccggcacggg acaaggcgcg ggacggcgta gatcaggtcg 60

acaccagtct tcatccgc 78

<210> 4

<211> 76

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Aptámero TLRApt#4F con capacidad de unirse específicamente e

ES 2 555 160 A1

inhibir a TLR-4

<400> 4
gcggatgaag actggtgtgc caataaacca tatcgccgcg ttagcatgta ctcggttggc 60

cctaaatacg agcaac 76

<210> 5
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Cebador para amplificar aptámeros

<400> 5
gcggatgaag actggtgt 18

<210> 6
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Cebador para amplificar aptámeros

<400> 6
gttgctcgta tttagggc 18



- ②① N.º solicitud: 201430955
②② Fecha de presentación de la solicitud: 24.06.2014
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: **C12N15/115** (2010.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	WO 2006138681 A2 (UNIV ROCHESTER et al.) 28.12.2006, reivindicaciones.	1-17
A	TOMOYA WATANABE et al. Isolation and Characterization of RNA aptamers specific for the Human Toll-like receptor 3 ectodomain. JUN 2009. Viva Origino. Vol. 37, páginas 10-18.	1-17
A	CHANG Y -C. et al. Identification and characterization of oligonucleotides that inhibit Toll-like receptor 2-associated immune responses. FASEB JOURNAL. 2009. Vol. 23, Nº 9. Páginas 3078-3088. ISSN 1530-6860 (electronic).	1-17
A	WO 2012118911 A1 (QUARK PHARMACEUTICALS INC et al.) 07.09.2012, todo el documento.	1-17

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
16.11.2015

Examinador
J. Manso Tomico

Página
1/4

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

C12N

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

INVENES, EPODOC, WPI, EMBASE. BIOSIS, MEDLINE. SEARCH SEQUENCES EBI SITE.

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 16.11.2015

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-17	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-17	SI
	Reivindicaciones	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	WO 2006138681 A2 (UNIV ROCHESTER et al.)	28.12.2006
D02	TOMOYA WATANABE et al. Isolation and Characterization of RNA aptamers specific for the Human Toll-like receptor 3 ectodomain. JUN 2009. Viva Origino. Vol. 37, páginas 10-18.	30.09.2011
D03	CHANG Y -C. et al. Identification and characterization of oligonucleotides that inhibit Toll-like receptor 2-associated immune responses. FASEB JOURNAL. 2009. Vol. 23, Nº 9. Páginas 3078-3088. ISSN 1530-6860 (electronic)	
D04	WO 2012118911 A1 (QUARK PHARMACEUTICALS INC et al.)	07.09.2012

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

La presente solicitud se refiere a aptámeros de ácido nucleico con capacidad de unión específica a TLR4.

Las reivindicaciones 1-4 se refieren a los aptámeros de unión a TLR4 que comprenden las secuencias SEQ.ID. Nºs 1-4. Las reivindicaciones 7-11 se refieren al uso de los mismos para la detección de TLR4. Las reivindicaciones 12- 14 se refieren a un método para inhibir TLR4. Las reivindicaciones 14, 16 se refieren a usos de los aptámeros para la fabricación de medicamentos para el tratamiento de patología que cursen con activación de TLR4, en concreto el ictus, y la reivindicación 17 caracteriza una composición farmacéutica que comprenda los aptámeros referidos en las anteriores reivindicaciones.

Ninguno de los documentos del estado de la técnica divulga las secuencias de los aptámeros de TLR4, ni los métodos y usos de los mismos, por lo que las reivindicaciones 1-17 cumplirían con el requisito de novedad tal y como se menciona en el art. 6 de la ley 11/1986.

Tomando en consideración D01 como el documento del estado de la técnica más cercano al objeto de la invención, este documento divulga un método para inhibir la supresión de células T CD8 + por el hígado a través de la utilización de inhibidores de los receptores de tipo TLR 4.

El objeto de la presente invención difiere del objeto anterior en que los inhibidores de TLR 4 son aptámeros de secuencias SEQ. ID. Nºs: 1-4.

El problema que resuelve la presente invención se puede considerar como la provisión de inhibidores y métodos de inhibición alternativos de TLR4.

La solución que se presenta en la presente solicitud se considera que implica actividad inventiva, tal y como se menciona en el art. 8 de la ley 11/1986, debido a que aunque en D02 se muestra que el diseño de aptámeros se algo conocido en el estado de la técnica para la inhibición de la actividad de otros receptores de la misma familia, en este caso TLR3, sin embargo no hay ninguna indicación en este documento, o en D03 de indicios que permitan llegar a el diseño de un aptámero que funcione como inhibidor de TLR4. Es más, en el documento D02 se menciona que a la hora de encontrar aptámeros para TLR3, dos aptámeros con alta afinidad por este receptor, no tuvieron influencia a la hora de inhibir su actividad. El experto en la materia, aún siendo obvio intentar diseñar aptámeros para inhibir TLR4, no tendría a priori expectativas de éxito a la hora de conseguirlo. Por tanto, las reivindicaciones 1-17 se consideran inventivas.