

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 589 796**

51 Int. Cl.:

C12N 15/115 (2010.01)

A61K 31/7088 (2006.01)

A61M 1/36 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.03.2012 PCT/EP2012/053616**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.09.2012 WO12119938**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.03.2012 E 12711799 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.06.2016 EP 2683826**

54 Título: **Uso de aptámeros en el tratamiento y/o diagnóstico de enfermedades autoinmunitarias**

30 Prioridad:

07.03.2011 EP 11157229
07.03.2011 US 201161449772 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
16.11.2016

73 Titular/es:

CHARITÉ UNIVERSITÄTSMEDIZIN BERLIN
(50.0%)
Charitéplatz 1
10117 Berlin, DE y
MAX-DELBRÜCK-CENTRUM FÜR MOLEKULARE
MEDIZIN (50.0%)

72 Inventor/es:

SCHIMKE, INGOLF;
HABERLAND, ANNEKATHRIN y
WALLUKAT, GERD

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 589 796 T3

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

DESCRIPCIÓN

Uso de aptámeros en el tratamiento y/o diagnóstico de enfermedades autoinmunitarias

El sistema inmunitario constituye una parte esencial de los animales. Los mamíferos hacen uso de su sistema inmunitario en la defensa frente a microorganismos, en la detección y la eliminación de células anómalas del tipo, por ejemplo, de células tumorales, y en la regeneración de tejido. De esta forma, el organismo se apoya en dos mecanismos de defensa interconectados, inmunidad humoral e inmunidad celular.

Los anticuerpos, cuando se unen a su antígeno, son desencadenantes de la respuesta inmunitaria humoral. Los anticuerpos pueden actuar de múltiples maneras. Además de la neutralización del antígeno, los anticuerpos activan también el sistema del complemento. Existen también anticuerpos que se dirigen a los antígenos del propio cuerpo. Como razones para la generación de los denominados autoanticuerpos, se consideran el mimetismo molecular y/o la activación inespecífica. La unión específica de los anticuerpos a los antígenos propios puede activar los linfocitos citotóxicos naturales (linfocitos NK) que son capaces de facilitar la degradación de estos antígenos.

Las enfermedades autoinmunitarias se basan en dicho reconocimiento específico y en la unión de los anticuerpos dirigidos a las propias partes constituyentes del cuerpo que desencadena una respuesta inmunitaria contra las propias células o tejidos. Además de este efecto inmunoestimulador, los autoanticuerpos pueden contribuir al desarrollo de fenotipos patógenos también por otros mecanismos. Se sabe bien que existen también autoanticuerpos que pueden ser específicos de la parte extracelular de los receptores acoplados a la proteína G tales como: receptor alfa-1 adrenérgico, receptor beta-1 adrenérgico, receptor beta-2 adrenérgico, receptor ETA de la endotelina1, receptor M₂ muscarínico, receptor AT1 de la angiotensina II y/o receptores activados de la proteinasa (PAR) que, tras la unión específica, pueden activar o bloquear estos receptores. La presencia de dichos anticuerpos en un organismo puede conducir a efectos agonistas o antagonistas en el sentido de una activación permanente o bloqueo de los receptores respectivos que podría jugar un papel en el desarrollo de la enfermedad.

La cardiomiopatía dilatada (DCM) es una de las enfermedades en la que un alto porcentaje de pacientes presenta dichos autoanticuerpos activantes que se unen a las partes extracelulares del receptor beta-1 adrenérgico, en particular al 1^{er} o 2^o bucle del receptor beta-1 adrenérgico. Por consiguiente, se sugirió una patogénesis autoinmune de la DCM es estos pacientes. Tras la unión de estos autoanticuerpos, los receptores se activan continuamente (Jahns y col. (2004) Direct evidence for a beta-1-adrenergic receptor-directed autoimmune attack as a cause of idiopathic cardiomyopathy. J.Clin.Invest. 113, 1419 a 1429).

En estudios recientes, se pudo demostrar que la eliminación de estos autoanticuerpos de la sangre mediante la adsorción de la inmunoglobulina contribuye a la regeneración del músculo cardíaco (Wallukat G, Reinke P, Dorffel Wv, Luther HP, Bestvater K, Felix SB, Baumann G. (1996) Removal of autoantibodies in dilated cardiomyopathy by immunoabsorption. Int J Cardiol. 54:191-195; Müller J, Wallukat G, Dandel M, Bieda H, Brandes K, Spiegelsberger S, Nissen E, Kunze R, Hetzer R (2000) Immunoglobulin adsorption in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. Circulation. 101:385-391. W.v. Dörfel, S.B. Felix, G. Wallukat, S. Brehme, K. Bestvater, T. Hofmann, F.K. Kleber, G. Baumann, P. Reinke (1997) Short-term hemodynamic effects of immunoabsorption in dilated cardiomyopathy. Circulation 95, 1994-1997 and W.v. Dorffel, G. Wallukat, Y. Dorffel, S.B. Felix, G. Baumann (2004) Immunoabsorption in idiopathic dilated cardiomyopathy, a 3-year follow-up. Int J. Cardiol. 97, 529-534).

Existen otras enfermedades del sistema cardiovascular para las que se ha sugerido una relación con la presencia de autoanticuerpos contra receptores acoplados de la proteína G tales como, cardiomiopatía de Chagas, cardiomiopatía de periparto, miocarditis, hipertensión pulmonar e hipertensión maligna. También se han encontrado autoanticuerpos contra receptores acoplados a la proteína G en pacientes, por ejemplo, con glaucoma, diabetes mellitus, enfermedad de Alzheimer, hiperplasia prostática benigna, esclerodermia, síndrome de Raynaud, psoriasis, y preeclampsia y en enfermedad de Chagas crónica así como en personas con rechazo al aloinjerto de riñón. Es un objeto de la presente invención proporcionar novedosas modalidades para su uso en el tratamiento y/o el diagnóstico de enfermedades autoinmunitarias que se asocian con la presencia de autoanticuerpos en el paciente.

La presente invención proporciona un aptámero que comprende o consiste en la secuencia del ácido nucleico de la SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 2, SEQ ID No. 3 y/o una secuencia de ácido nucleico que es al menos un 80 % idéntica a una de la SEQ ID No. 1, 2 y 3 para su uso en el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias interfiriendo con la interacción de autoanticuerpos específicos de los receptores acoplados a la proteína G asociados con enfermedades autoinmunitarias, en el que la enfermedad autoinmunitaria es cardiomiopatía, cardiomiopatía dilatada (DCM), cardiomiopatía de periparto (PPCM), cardiomiopatía idiopática, cardiomiopatía de Chagas, megacolon de Chagas, megaesófago de Chagas, neuropatía de Chagas, hiperplasia prostática benigna, esclerodermia, psoriasis, síndrome de Raynaud, preeclampsia, rechazo al aloinjerto de riñón, miocarditis, glaucoma, hipertensión, hipertensión pulmonar, hipertensión maligna, y/o enfermedad de Alzheimer, y en el que el aptámero se une específicamente y con elevada afinidad a dichos autoanticuerpos.

Los aptámeros para su uso de acuerdo con la invención se caracterizan por que comprenden o consisten en una secuencia de ácido nucleico de 15 nucleótidos con la SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 2, SEQ ID No. 3 y/o una secuencia de ácido nucleico que es al menos un 80 % idéntica a una de la SEQ ID No. 1, 2 y 3. El 15-mero: GGT TGG TGT

GGT TGG (SEQ ID No. 1), el 26-mero: CGC CTA GGT TGG GTA GGG TGG CG (SEQ ID No. 2) y el 12-mero: GGT TGG TGT GGT (SEQ ID No. 3) son todos ellos capaces y responsables, independientemente entre sí, de la especificidad diana del aptámero para su uso de acuerdo con la invención. Se pueden añadir moléculas o secuencias de ácidos nucleicos adicionales al extremo 5' y/o al extremo 3' de la secuencia de ácido nucleico con la SEQ ID No. 1, 2 y/o 3. Dicho 15-mero (SEQ ID No.1) se ha aislado en primer lugar para su unión a la trombina, véase el documento US 5.543.293 que es también verdadero para el 26-mero (SEQ ID No. 2) que se describe en primer lugar en el documento WO/2010/033167. El primero mencionado ya se ha usado con el nombre ARC183 en los ensayos en fase clínica I para la inhibición de la trombina, es decir, como anticoagulante para uso potencial en escenarios cardiovasculares agudos. El 26-mero se ha usado con el nombre NU172 (ARC 2172) en un ensayo en fase clínica II (identificador gubernamental del ensayo clínico: NCT 00808964). Sin embargo, resultó para el 15-mero (SEQ. ID No. 1) que la cantidad de aptámero necesaria para conseguir la anticoagulación deseada dio como resultado un perfil de dosificación subóptima.

Se ha encontrado de forma sorprendente que los aptámeros para su uso de acuerdo con la invención se pueden usar para interferir con la interacción de anticuerpos, en particular de autoanticuerpos, específicos de los receptores acoplados a la proteína G asociados con enfermedades autoinmunitarias. En particular, esto demostraría que los aptámeros para su uso de acuerdo con la invención son capaces de unirse a autoanticuerpos específicos del receptor alfa-1 adrenérgico, el receptor beta-1 adrenérgico, el receptor beta-2 adrenérgico, el receptor ETA de la endotelina 1, el receptor M₂ muscarínico, el receptor AT1 de la angiotensina II, y/o los receptores PAR y de inhibir la interacción específica de estos autoanticuerpos con sus proteínas diana. Inhibiendo estas interacciones, los aptámeros para su uso de acuerdo con la invención disminuyen o incluso suprimen la activación permanente de los receptores acoplados a la proteína G respectiva sin necesidad de eliminación de estos anticuerpos. De esta manera, la presente invención proporciona compuestos que se describieron en un primer momento por su adecuación para uso en el tratamiento y/o el diagnóstico de enfermedades autoinmunitarias, en particular de las enfermedades autoinmunitarias asociadas con la presencia de autoanticuerpos que reconocen los receptores acoplados a la proteína G, concretamente las enfermedades autoinmunes asociadas con la presencia de autoanticuerpos específicos del receptor alfa-1 adrenérgico, el receptor beta-1 adrenérgico, el receptor beta-2 adrenérgico, el receptor ETA de la endotelina 1, el receptor M₂ muscarínico, el receptor AT1 de la angiotensina II, y/o los receptores PAR. Además, tras la inmovilización, los aptámeros para su uso de acuerdo con la invención son capaces de capturar los autoanticuerpos indicados anteriormente. De esta forma, se proporciona en 1^{er} lugar una plataforma para establecer una tecnología de aféresis para la limpieza del suero del paciente de los autoanticuerpos y en 2^o lugar para desarrollar una herramienta analítica para la medida de los autoanticuerpos. La última se puede usar, en particular, para el diagnóstico de las enfermedades autoinmunitarias.

Para el fin de la presente invención, el término "aptámero" se refiere a un oligonucleótido que comprende o consiste en la secuencia del ácido nucleico SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 2, SEQ ID No. 3 y/o una secuencia de ácido nucleico que es al menos un 80 % idéntica a una de la SEQ ID No. 1, 2 y 3 y es capaz de unirse específicamente y con una elevada afinidad a una molécula diana concreta, por ejemplo, a un autoanticuerpo dirigido contra un receptor acoplado a la proteína G similar, por ejemplo, al receptor alfa-1 adrenérgico, al receptor beta-1 adrenérgico, al receptor beta-2 adrenérgico, al receptor ETA de la endotelina 1, al receptor M₂ muscarínico, al receptor AT1 de la angiotensina II, y/o los receptores PAR.

El aptámero para su uso de acuerdo con la invención comprende o consiste de una secuencia de moléculas de ácidos nucleico, los nucleótidos. El aptámero para su uso de acuerdo con la invención comprende preferentemente nucleótidos D y o L no modificados y/o modificados. De acuerdo con el código común de una letra de las bases de ácidos nucleicos, "C" significa citosina, "A" significa adenina, "G" significa guanina, y "T" significa timina, mientras "U" significa uracilo. Si no se indica a continuación lo contrario, el término "nucleótido" se referirá a ribonucleótidos y desoxirribonucleótidos. Respectivamente, los términos "nucleótido modificado con 2'-flúor", "nucleótido modificado con 2'-metoxi", y/o "nucleótido modificado con 2-amino" se refiere a ribonucleótidos modificados y a desoxirribonucleótidos modificados.

Se considera que un aptámero consiste o comprende una secuencia de ácido nucleico que es al menos un 80 % idéntica a una de la SEQ ID No. 1, 2 y 3, si dicho aptámero comprende una secuencia contigua de nucleótidos que muestra al menos un 80 % de identidad de la secuencia sobre la longitud completa de la SEQ ID No. 1, 2 o 3 con la secuencia de nucleótidos de la secuencia de SEQ ID No. 1, 2 o 3, respectivamente. Son bien conocidos en la materia los medios para determinar la identidad de la secuencia y pueden comprender, por ejemplo, el uso del algoritmo blastn.

El aptámero para su uso de acuerdo con la invención puede comprender una secuencia de ácido nucleico de ≥ 15 nucleótidos a ≤ 160 nucleótidos, preferentemente de ≥ 15 nucleótidos a ≤ 120 nucleótidos.

El aptámero para su uso de acuerdo con la invención puede comprender o consistir en una secuencia de nucleótidos de ADN o ARN y, de esta manera, puede denominarse aptámero de ADN o aptámero de ARN, respectivamente. Se entiende que, si el aptámero para su uso de acuerdo con la invención comprende una secuencia de nucleótidos de ARN, dentro de los motivos de la secuencia especificados a lo largo de la presente invención, la timina se sustituye por uracilo. Las secuencias de nucleótidos de ARN para su uso de acuerdo con la presente invención son idénticas a las secuencias de nucleótidos de ADN para su uso de acuerdo con la invención con la condición de que T se

sustituye por U. En aras de la concisión, a lo largo de la presente invención se hace referencia únicamente a las secuencias de nucleótidos explícitas de ADN. Sin embargo, se entiende que las secuencias de nucleótidos de ARN respectivas están comprendidas también por la presente invención.

5 Se prefiere particularmente el uso de aptámeros de ADN. Los aptámeros de ADN son normalmente más estables en plasma que los aptámeros de ARN.

Los aptámeros para su uso de acuerdo con la invención pueden comprender una secuencia de nucleótidos que contiene los nucleótidos 2' modificados por ejemplo, por ejemplo, nucleótidos modificados con 2'-flúor, 2'-metoxi y/o 2'-amino. El aptámero para su uso de acuerdo con la invención puede comprender también una mezcla de desoxirribonucleótidos, desoxirribonucleótidos modificados, ribonucleótidos y/o ribonucleótidos modificados.

10 El aptámero para su uso de acuerdo con la invención puede comprender modificaciones. Dichas modificaciones abarcan, por ejemplo, la alquilación, es decir, metilación, arilación o acetilación de al menos un nucleótido, la inclusión de enantiómeros y/o la fusión de aptámeros con uno o más nucleótidos o secuencias de ácidos nucleicos diferentes. Dichas modificaciones pueden comprender por ejemplo modificaciones 5' y/o 3'-CAP- o estructuras 5' y/o 3'-PEG. De forma alternativa, o adicional, el aptámero para su uso de acuerdo con la invención puede comprender
15 nucleótidos modificados, seleccionados de ácidos nucleicos bloqueados, nucleótidos modificados con 2'-flúor, 2'-metoxi y/o 2'-amino.

Los ácidos nucleicos bloqueados (LNA) representan los análogos de los nucleótidos de ARN respectivos en los que se ha fijado la conformación. Los oligonucleótidos de los ácidos nucleicos bloqueados comprenden uno o más
20 ribonucleósidos bicíclicos, en los que el grupo 2'-OH está conectado con el átomo de carbono C4 mediante un grupo metileno. Los ácidos nucleicos bloqueados presentan una estabilidad aumentada frente a las nucleasas en comparación con los respectivos homólogos de aptámeros de ARN sin modificar. También, las propiedades de hibridación están mejoradas, lo que permite una potenciación de la afinidad y la especificidad del aptámero. Otra modificación preferida es la adición de las denominadas estructuras 3'-CAP-, estructuras 5'-CAP y/o de un nucleótido de guanosina modificado (por ejemplo, 7-metil-guanosina) en el extremo 3' y/o 5' del aptámero. Dicha modificación
25 del extremo 3' y/o 5' tiene el efecto de que el aptámero se protege de una degradación rápida mediante las nucleasas.

De forma alternativa o adicional, el aptámero para su uso de acuerdo con la invención puede presentar un extremo 5' y/o 3' pegilado. Una modificación 5'-PEG y/o 3'-PEG comprende la adición de al menos una unidad de polietilenglicol (PEG), preferentemente, el grupo PEG comprende 1 a 900 grupos etileno, más preferentemente de 1
30 a 450 grupos etileno. En una realización preferida, el aptámero comprende unidades PEG lineales con HO-(CH₂CH₂O)_n-H, en las que n es un entero de 1 a 900, preferentemente n es un entero de 1 a 450.

El aptámero para su uso de acuerdo con la invención puede comprender o consistir en una secuencia de ácido nucleico con una estructura de fosfotioato o puede estar completamente o en parte configurado como un ácido nucleico peptídico (PNA). Una ventaja de modificar el aptámero para su uso de acuerdo con la invención mediante
35 una o más de las maneras mencionadas anteriormente es que el aptámero se puede estabilizar contra influencias perjudiciales similares, por ejemplo, a las nucleasas presentes en el ambiente en el que se usa el aptámero. Dichas modificaciones son también adecuadas para adaptar las propiedades farmacológicas del aptámero. Las modificaciones no alteran preferentemente la afinidad o la especificidad del aptámero.

El aptámero para su uso de acuerdo con la invención puede conjugarse también a una molécula transportadora y/o a una molécula indicadora. Las moléculas transportadoras comprenden moléculas que, cuando se conjugan al aptámero, prolongan la vida media en el plasma del aptámero conjugado en plasma humano, potenciando, por ejemplo, la estabilidad y/o afectando a la velocidad de excreción. Un ejemplo de una molécula transportadora adecuada es PEG. Las moléculas transportadoras comprenden moléculas que permiten la detección del aptámero conjugado. Los ejemplos de dichas moléculas indicadoras son GFP, biotina, colesterol, de tipo colorantes, por ejemplo, colorantes fluorescentes, moléculas y/o compuestos indicadores electroquímicamente activos que comprenden restos radioactivos, en particular radionucleidos adecuados para detección PET (tomografía de emisión de positrones) similares, por ejemplo, a ¹⁸F, ¹¹C, ¹³N, ¹⁵O, ⁸²Rb o ⁶⁸Ga. La persona experta es bien consciente de los transportadores y las moléculas indicadoras adecuadas y de los medios para conjuarlas al aptámero para su uso de acuerdo con la invención. El aptámero para su uso de acuerdo con la invención inhibe el efecto agonístico o bloqueante de un anticuerpo. Para el fin de la presente invención, el término "anticuerpo" se refiere a anticuerpos que se producen naturalmente, incluyendo, por ejemplo, autoanticuerpos, en particular autoanticuerpos de un paciente que padece una enfermedad autoinmunitaria relacionada con la presencia de autoanticuerpos específicos de un receptor acoplado a la proteína G similar por ejemplo, al receptor alfa-1 adrenérgico, el receptor beta-1 adrenérgico, el receptor beta-2 adrenérgico, el receptor ETA de la endotelina 1, el receptor M₂ receptor muscarínico, el receptor AT1 de la angiotensina II, y/o los receptores PAR, y anticuerpos modificados o genomanipulados. Un autoanticuerpo es un anticuerpo fabricado por el sistema inmunitario de un individuo que se dirige contra una o más de las proteínas propias del individuo. Sin embargo, el término anticuerpo no está limitado a un anticuerpo con la arquitectura de cadena pesada y ligera clásica. Los términos "anticuerpo" o "anticuerpos" como se usan en el presente documento son términos reconocidos en la técnica y se entiende que se refieren a moléculas o fragmentos
55 activos de moléculas que se unen a antígenos dados, particularmente los términos se refieren a moléculas de
60

inmunoglobulina y a porciones inmunológicamente activas, es decir, moléculas que contienen un sitio de unión que se une específicamente a un antígeno. Una inmunoglobulina es una proteína que comprende uno o más polipéptidos sustancialmente codificados por los genes de la región constante de la inmunoglobulina kappa y lambda, alfa, gamma, delta, épsilon y mu, así como la miríada de genes de la región variable de la inmunoglobulina. Las cadenas ligeras se clasifican en kappa o lambda. Las cadenas pesadas se clasifican en gamma, mu, alfa, delta o épsilon, que definen a la vez las clases de inmunoglobulina, IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, respectivamente. También se conocen las subclases de la cadena pesada. Por ejemplo, las cadenas pesadas de IgG en seres humanos pueden ser cualquiera de las subclases IgG1, IgG2, IgG3 y IgG4. El anticuerpo puede ser preferentemente de IgM y/o IgG o cualquiera de sus subclases (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4).

Se pretende que los anticuerpos comprendidos en el alcance de la presente invención incluyan autoanticuerpos, anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos quiméricos, monocatenarios, biespecíficos, simianizados, humanos y humanizados así como sus fragmentos activos. Los ejemplos de fragmentos activos de moléculas que se unen a antígenos conocidos incluyen las cadenas ligera y pesada separadas, fragmentos Fab, Fab/c, Fv, Fab', y F(ab')₂, incluyendo los productos de una biblioteca de expresión de la inmunoglobulina de Fab y fragmentos de unión a epítomos de cualquiera de los anticuerpos y fragmentos mencionados anteriormente.

Los aptámeros para su uso de acuerdo con la invención se usan en el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias. Como se usa para el fin de la presente invención, el término "enfermedad autoinmunitaria" o "enfermedades autoinmunitarias" se refiere a enfermedades autoinmunitarias, en particular a enfermedades autoinmunitarias en un ser humano, en el que las enfermedades autoinmunitarias están asociadas con la presencia de autoanticuerpos específicos para un receptor acoplado a la proteína G. Dichos autoanticuerpos pueden estar implicados preferentemente en la patogénesis de la enfermedad autoinmunitaria y, como tales, pueden estar presentes en el suero de un paciente que padece dicha enfermedad autoinmunitaria. De forma más preferente, las enfermedades autoinmunitarias son enfermedades autoinmunitarias asociadas con la presencia en el suero del paciente de auto anticuerpos específicos para el receptor alfa-1 adrenérgico, el receptor beta-1 adrenérgico, el receptor beta-2 adrenérgico, el receptor ETA de la endotelina 1, el receptor M₂ muscarínico, el receptor AT1 de la angiotensina II, y/o los receptores PAR. En la presente invención, la enfermedad autoinmunitaria es la cardiomiopatía, cardiomiopatía dilatada (DCM), cardiomiopatía de periparto (PPCM), cardiomiopatía idiopática, cardiomiopatía de Chagas, megacolon de Chagas, mesoesófago de Chagas, neuropatía de Chagas, hiperplasia prostática benigna, esclerodermia, psoriasis, síndrome de Raynaud, preeclampsia, rechazo al injerto de riñón, miocarditis, glaucoma, hipertensión, hipertensión pulmonar, hipertensión maligna, y/o enfermedad de Alzheimer. Más preferentemente, el término "enfermedad autoinmunitaria" o "enfermedades autoinmunitarias" se refiere a las enfermedades autoinmunitarias de cardiomiopatía dilatada (DCM), cardiopatía de periparto (PPCM), cardiomiopatía de Chagas, megacolon de Chagas, glaucoma, hipertensión, hipertensión pulmonar, hipertensión maligna, rechazo al injerto de riñón, síndrome de Raynaud y/o enfermedad de Alzheimer.

Es bien conocida en la técnica la fabricación o producción en masa de aptámeros para su uso de acuerdo con la invención y representa una mera actividad rutinaria.

La presente invención se dirige también a una composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la invención que comprende al menos un aptámero para su uso de acuerdo con la invención y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable. La invención se dirige también a una composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la invención que comprende un aptámero para su uso de acuerdo con la invención o una mezcla de diferentes aptámeros para su uso de acuerdo con la invención y un excipiente farmacéuticamente aceptable similar, por ejemplo, a un transportador o diluyente adecuado. Preferentemente, el aptámero para su uso de acuerdo con la invención constituye un principio activo de la composición farmacéutica y/o está presente en una cantidad eficaz.

El término "cantidad eficaz" denota una cantidad del aptámeros para su uso de acuerdo con la invención que tiene un efecto profiláctico, diagnóstico o terapéutico relevante sobre una enfermedad o dolencias patológicas. Un efecto profiláctico evita la aparición de una enfermedad. Un efecto terapéuticamente relevante alivia en alguna extensión uno o más síntomas de una enfermedad o vuelve normales tanto de forma normal como completa uno o más parámetros fisiológicos o bioquímicos asociados con o causantes de la enfermedad o dolencias patológicas. La cantidad respectiva para administrar el aptámero para su uso de acuerdo con la invención es suficientemente elevada a fin de conseguir el efecto profiláctico, diagnóstico o terapéutico deseado. La persona experta en la materia entenderá que el nivel de dosis específico, la frecuencia y el periodo de administración a cualquier mamífero concreto dependerá de una variedad de factores incluyendo la actividad de los componentes específicos empleados, la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo, la dieta, el tiempo de administración, la ruta de administración, la combinación del fármaco, y la gravedad del tratamiento específico. Utilizando medios y procedimientos bien conocidos, un experto en la técnica puede determinar la cantidad exacta como materia de experimentación rutinaria.

En la composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la invención, al menos un 20 % del contenido total del aptámero se prepara de un aptámero para su uso de acuerdo con la invención, preferentemente al menos un 50 %, más preferentemente al menos un 75 %, lo más preferente al menos un 95 %.

Cuando se usa para tratamiento, se administrará la composición farmacéutica generalmente como una formulación en asociación con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. El término "excipiente" se usa en el presente documento para describir cualquier ingrediente distinto del aptámero para uso de acuerdo con la

invención. La elección de excipiente dependerá en gran medida del modo particular de administración. Los excipientes pueden ser transportadores y/o diluyentes adecuados.

5 La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la invención puede administrarse por vía oral. La administración oral puede implicar el tragado, de tal manera que la composición penetra en el tracto gastrointestinal, puede emplearse la administración bucal o sublingual mediante la cual la composición penetra en el torrente sanguíneo directamente desde la boca.

10 Las formulaciones adecuadas para la administración oral incluyen formulaciones sólidas, tales como comprimidos; comprimidos revestidos, cápsulas que contienen partículas, líquidos, o polvos; pastillas para chupar (incluyendo rellenas de líquidos); y gomas de mascar; multipartículas y nanopartículas; geles; soluciones sólidas; liposomas; películas, óvulos, formulaciones para pulverización y líquidas.

15 Las formulaciones líquidas que incluyen suspensiones, soluciones, jarabes y elixires. Dichas formulaciones se pueden emplear como rellenos en cápsulas blandas o duras y comprenden normalmente un transportador, por ejemplo, agua, etanol, polietilenglicol, metilcelulosa, o un aceite adecuado, y uno o más agentes emulsionantes y/o agentes suspensores. Las formulaciones líquidas pueden prepararse también mediante la reconstitución de un sólido, por ejemplo, de un sobrecillo.

20 Para las formas farmacéuticas de comprimidos, dependiendo de la dosis, el aptámero para su uso de acuerdo con la invención se puede preparar desde 0,1 % en peso a 80 % en peso de la forma farmacéutica, más normalmente desde 5 % en peso a 60 % en peso de la forma farmacéutica. Además con respecto al aptámero para su uso de acuerdo con la invención, los comprimidos contienen generalmente un desintegrante. Los ejemplos de desintegrantes incluyen almidón glicolato de sodio, carboximetilcelulosa de sodio, croscarmelosa de sodio, crospovidona, polivinilpirrolidona, metil celulosa, celulosa microcristalina, hidroxipropilcelulosa sustituida con alquilo inferior, almidón, almidón pregelatinizado y alginato de sodio. Generalmente, el desintegrante comprenderá desde 1 % en peso a 25 % en peso, preferentemente desde 5 % en peso a 20 % en peso de la forma farmacéutica.

25 Los comprimidos pueden comprender excipientes adicionales similares, por ejemplo, a aglutinantes, agentes tensioactivos, lubricantes y/u otros posibles ingredientes similares, por ejemplo a, agentes antioxidantes, colorantes, agentes aromatizantes, conservantes y/o agentes enmascaradores del sabor.

30 Las mezclas de comprimidos pueden comprimirse directamente o mediante rodillo para formar comprimidos. Las mezclas o porciones de mezclas de comprimidos pueden comprimirse alternativamente mediante granulado en húmedo, seco, o fundido, congelarse en fundido, o extruirse antes de la compresión. La formulación final puede comprender una o más capas y puede estar recubierta o no recubierta; incluso puede encapsularse.

35 Las formulaciones sólidas para administración oral pueden formularse para que sean de liberación inmediata y/o modificada. Las formulaciones de liberación modificada incluyen liberación retardada, continua, pulsada, controlada, dirigida y programada. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la invención se puede administrar también directamente en el torrente sanguíneo, en el músculo, o en un órgano interno. Los medios adecuados para la administración parenteral incluyen la administración intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, intratecal, intraventricular, intrauretral, intaesternal, intracraneal, intramuscular y subcutánea. Los dispositivos adecuados para administración parenteral incluyen inyectores de aguja (incluyendo microagujas), inyectores exentos de agujas y técnicas de infusión.

40 Las formulaciones parenterales son normalmente soluciones acuosas que pueden contener excipientes tales como sales, hidratos de carbono, y agentes tamponantes (preferentemente a un pH de entre 3 a 9), pero, para algunas aplicaciones, pueden formularse de manera más adecuada como una solución no acuosa estéril o como una forma seca que se va a usar junto con un vehículo adecuado tal como agua estéril exenta de pirógenos.

45 La preparación de las formulaciones parenterales en condiciones estériles, por ejemplo mediante liofilización, se pueden llevar a cabo fácilmente mediante técnicas farmacéuticas normalizadas bien conocidas por los expertos en la materia.

La solubilidad de la composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la invención utilizada en la preparación de las soluciones parenterales puede aumentarse mediante el uso de técnicas de formulación adecuadas, tales como la incorporación de agentes potenciadores de la solubilidad.

50 Las formulaciones para administración parenteral pueden formularse para ser de liberación inmediata y/o modificada. Las formulaciones de liberación modificada incluyen liberación retardada, continua, pulsada, controlada, dirigida y programada. De esta manera, los compuestos para su uso de acuerdo con la invención pueden formularse para la administración sólida, semisólida, o líquida tixotrópica como un depósito implantado que proporciona la liberación modificada del compuesto activo. Los ejemplos de dichas formulaciones incluyen endoprótesis vasculares revestidas de fármacos y microesferas de PGLA ácido poli(di-láctico-coglicólico) (PGLA).

55 La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la invención puede administrarse también tópicamente a la piel o a la mucosa, esto es, dérmica o transdérmicamente. Las formulaciones típicas para este íin incluyen geles,

5 hidrogeles, lociones, soluciones, cremas, pomadas, polvos de empolvado, apósitos, espumas, películas, parches para la piel, obleas, implantes, esponjillas, fibras, vendajes y microemulsiones. También pueden usarse liposomas. Los transportadores típicos incluyen alcohol, agua, aceite mineral, vaselina líquida, vaselina blanca, glicerina, polietilenglicol y propilenglicol. Pueden incorporarse potenciadores de la penetración. Otros medios de administración tópica incluyen administración mediante electroporación, iontoforesis, fonoforesis, sonoforesis, e inyección con microagujas o exenta de agujas (por ejemplo, Powderject(TM), Bioject(TM), etc.). Las formulaciones para administración tópica pueden formularse para ser de liberación inmediata y/o modificada. Las formulaciones de liberación modificada incluyen liberación retardada, continua, pulsada, controlada, dirigida y programada.

10 Para la administración a pacientes humanos, la dosis diaria total del aptámero para su uso de acuerdo con la invención y/o la composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la invención está normalmente en el intervalo de 0,001 mg a 5000 mg dependiendo, por supuesto, del modo de administración. Por ejemplo, una dosis diaria intravenosa puede requerir solo de 0,001 a 40 mg. La dosis diaria total puede administrarse en dosis únicas o divididas y puede, a discreción del médico quedar fuera del intervalo típico proporcionado en el presente documento. Estas dosificaciones están basadas en un sujeto humano medio que tiene un peso de aproximadamente 65 kg a 15 70 kg. El médico podrá determinar con facilidad las dosis para sujetos cuyo peso se encuentre fuera de este intervalo, tales como niños y personas mayores.

La presente invención abarca también un kit para su uso de acuerdo con la invención que comprende un aptámero para su uso de acuerdo con la invención, un recipiente y opcionalmente instrucciones escritas para su uso y/o con los medios para la administración.

20 El aptámero, la composición farmacéutica y/o el kit para su uso de acuerdo con la invención se usan en el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias, en particular de enfermedades autoinmunitarias en un ser humano. Preferentemente, la enfermedades autoinmunitarias son enfermedades autoinmunitarias asociadas con la presencia de autoanticuerpos específicos de un receptor acoplado a la proteína G, en el que los autoanticuerpos están presentes en el suero de un paciente que padece dicha enfermedad autoinmunitaria. De forma más preferente, las enfermedades autoinmunitarias son enfermedades autoinmunitarias asociadas con la presencia en el suero del paciente de autoanticuerpos específicos del receptor alfa-1 adrenérgico, el receptor beta-1 adrenérgico, el receptor beta-2 adrenérgico, el receptor ETA de la endotelina 1, el receptor M₂ muscarínico, el receptor AT1 de la angiotensina II, y/o los receptores PAR. En la presente invención, la enfermedad autoinmunitaria es la cardiomiopatía, cardiomiopatía dilatada (DCM), cardiomiopatía de periparto (PPCM), cardiomiopatía idiopática, cardiomiopatía de Chagas, megacolon de Chagas, mesoesófago de Chagas, neuropatía de Chagas, hiperplasia prostática benigna, esclerodermia, psoriasis, síndrome de Raynaud, preeclampsia, rechazo al aloinjerto de riñón, miocarditis, glaucoma, hipertensión, hipertensión pulmonar, hipertensión maligna, y/o enfermedad de Alzheimer. Más preferentemente, el término "enfermedad autoinmunitaria" o "enfermedades autoinmunitarias" se refiere a las enfermedades autoinmunitarias de cardiomiopatía dilatada (DCM), cardiopatía de periparto (PPCM), cardiomiopatía de Chagas, megacolon de Chagas, glaucoma, hipertensión, hipertensión pulmonar, hipertensión maligna, rechazo al injerto de riñón, síndrome de Raynaud y/o enfermedad de Alzheimer.

Los términos "terapia", "tratamiento" y "terapéuticamente", como se usa en el presente documento, se refieren al acto de tratar, tal como se define "tratar" a continuación. Como se usa en el presente documento, el término "tratar" se refiere a invertir, aliviar o inhibir el progreso de una enfermedad, trastorno o dolencia, o uno o más síntomas de dicha enfermedad, trastorno o dolencia, a la cual se aplica dicho término. Como se usa en el presente documento, "tratar" puede referirse también a disminuir la probabilidad o incidencia de la incidencia de una enfermedad, trastorno o dolencia en un mamífero, en comparación con una población control no tratada, o en comparación con el mismo mamífero antes del tratamiento. Por ejemplo, como se usa en el presente documento, "tratar" puede referirse a evitar una enfermedad, trastorno o dolencia, y puede incluir retrasar o evitar el inicio de una enfermedad, trastorno o dolencia, o retrasar o evitar los síntomas asociados con una enfermedad, trastorno o dolencia. Como se usa en el presente documento, "tratar" puede referirse también a reducir la gravedad de una enfermedad, trastorno o dolencia o los síntomas asociados con dicha enfermedad, trastorno o dolencia antes de la aflicción a un mamífero con la enfermedad, trastorno o dolencia. Dicha prevención o reducción de la gravedad de una enfermedad, trastorno o dolencia antes de la aflicción se refiere a la administración de la composición para uso de acuerdo con la presente invención, como se describe en el presente documento, a un sujeto que no está en el momento de la administración afligido con la enfermedad, trastorno o dolencia. Como se usa en el presente documento "tratar" puede referirse también a evitar la reincidencia de una enfermedad, trastorno o dolencia o de uno o más síntomas asociados con dicha enfermedad, trastorno o dolencia.

55 Para el tratamiento y/o el diagnóstico de una enfermedad, sin tener en cuenta la ruta de administración, el aptámero para su uso de acuerdo con la invención se administra a una dosis diaria por ciclo de tratamiento de no más de 20 mg/kg de peso corporal, preferentemente de no más de 10 mg/kg de peso corporal, de forma más preferente seleccionado entre el intervalo de 1 µg/kg a 20 mg/kg de peso corporal, lo más preferente seleccionado entre un intervalo de 0,01 a 10 mg/kg de peso corporal. Como aspecto de referencia, se divulga también el uso de un aptámero para su uso de acuerdo con la invención o una composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la invención para la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o el diagnóstico de una enfermedad autoinmunitaria. Preferentemente, la enfermedad autoinmunitaria es cardiomiopatía, cardiomiopatía dilatada (DCM), cardiomiopatía de periparto (PPCM), cardiomiopatía idiopática, cardiomiopatía de Chagas, megacolon de Chagas,

mesoesófago de Chagas, neuropatía de Chagas, hiperplasia prostática benigna, esclerodermia, psoriasis, síndrome de Raynaud, preeclampsia, rechazo al aloinjerto de riñón, miocarditis, glaucoma, hipertensión, hipertensión pulmonar, hipertensión maligna, y/o enfermedad de Alzheimer. Incluso de forma más preferente, el término "enfermedad autoinmunitaria" o "enfermedades autoinmunitarias" se refiere a las enfermedades autoinmunitarias de cardiomiopatía dilatada (DCM), cardiopatía de periparto (PPCM), cardiomiopatía de Chagas, megacolon de Chagas, glaucoma, hipertensión, hipertensión pulmonar, hipertensión maligna, rechazo al injerto de riñón, síndrome de Raynaud y/o enfermedad de Alzheimer.

En otro aspecto de referencia, un procedimiento de tratamiento o diagnóstico de una enfermedad autoinmunitaria, en el que a un individuo que necesita dicho tratamiento recibe una cantidad eficaz de un aptámero para su uso de acuerdo con la invención o una composición farmacéutica de la invención se divulga adicionalmente. Preferentemente, la enfermedad autoinmunitaria es cardiomiopatía, cardiomiopatía dilatada (DCM), cardiomiopatía de periparto (PPCM), cardiomiopatía idiopática, cardiomiopatía de Chagas, megacolon de Chagas, mesoesófago de Chagas, neuropatía de Chagas, hiperplasia prostática benigna, esclerodermia, psoriasis, síndrome de Raynaud, preeclampsia, rechazo al aloinjerto de riñón, miocarditis, glaucoma, hipertensión, hipertensión pulmonar, hipertensión maligna, y/o enfermedad de Alzheimer. Incluso de forma más preferente, el término "enfermedad autoinmunitaria" o "enfermedades autoinmunitarias" se refiere a las enfermedades autoinmunitarias de cardiomiopatía dilatada (DCM), cardiopatía de periparto (PPCM), cardiomiopatía de Chagas, megacolon de Chagas, glaucoma, hipertensión, hipertensión pulmonar, hipertensión maligna, rechazo al injerto de riñón, síndrome de Raynaud y/o enfermedad de Alzheimer.

El aptámero para su uso de acuerdo con la invención, cuando se usa para el tratamiento o el diagnóstico de una enfermedad autoinmunitaria, no necesita necesariamente administrarse a un individuo o paciente. Puede conseguirse también el efecto terapéutico o diagnóstico mediante el uso del aptámero para su uso de acuerdo con la invención para la eliminación de anticuerpo, de forma similar, por ejemplo, a los autoanticuerpos procedentes del cuerpo o de los fluidos corporales. Dicha eliminación puede comprender la aplicación del aptámero para su uso de acuerdo con la invención en un escenario donde el aptámero para su uso de acuerdo con la invención se pone en contacto con un fluido corporal únicamente *ex vivo*, por ejemplo, durante la adsorción inmunitaria y/o aféresis, de tal manera que el aptámero para su uso de acuerdo con la invención no penetra en el cuerpo del individuo o paciente que se va a tratar. De esta manera, se divulga también una columna de aféresis que comprende un aptámero para su uso de acuerdo con la invención. La aféresis es una tecnología médica en la que la sangre de un donante o paciente se pasa a través de un aparato que separa un constituyente concreto y el resto vuelve posteriormente a la circulación del donante o paciente. El aptámero para su uso de acuerdo con la invención se puede usar como ingrediente selectivo durante la aféresis. El ingrediente selectivo es responsable de separar específicamente los constituyentes particulares deseados, concretamente los anticuerpos o autoanticuerpos presentes en la muestra o la sangre que son diana específica del aptámero para su uso de acuerdo con la invención. El aptámero para su uso de acuerdo con la invención se puede usar como ingrediente selectivo en la aféresis terapéutica de sangre o sus partes derivadas de un paciente que padece una enfermedad autoinmunitaria. La enfermedad autoinmunitaria puede ser cardiomiopatía, cardiomiopatía dilatada (DCM), cardiomiopatía de periparto (PPCM), cardiomiopatía idiopática, cardiomiopatía de Chagas, megacolon de Chagas, mesoesófago de Chagas, neuropatía de Chagas, hiperplasia prostática benigna, esclerodermia, psoriasis, síndrome de Raynaud, preeclampsia, rechazo al aloinjerto de riñón, miocarditis, glaucoma, hipertensión, hipertensión pulmonar, hipertensión maligna, y/o enfermedad de Alzheimer. El término "enfermedad autoinmunitaria" o "enfermedades autoinmunitarias" se puede referir a las enfermedades autoinmunitarias de cardiomiopatía dilatada (DCM), cardiopatía de periparto (PPCM), cardiomiopatía de Chagas, megacolon de Chagas, glaucoma, hipertensión, hipertensión pulmonar, hipertensión maligna, rechazo al injerto de riñón, síndrome de Raynaud y/o enfermedad de Alzheimer.

La presente invención se refiere también a un aptámero para su uso de acuerdo con la invención acoplado a un soporte sólido. La persona experta en la materia es muy consciente de las técnicas y materiales que se pueden usar para producir dichos aptámeros acoplados a un soporte sólido. En una realización preferida, el soporte sólido comprende un material sólido que es aplicable en ensayos médicos, bioquímicos o biológicos, de forma similar, por ejemplo, a los materiales usados en la aféresis o ensayos ELISA. Dicho material sólido comprende polímeros que se utilizan usualmente como soporte en ensayos médicos, bioquímicos o biológicos. En particular, el aptámero para su uso de acuerdo con la invención se puede acoplar a un soporte sólido que permite el uso del producto resultantes en la fabricación de una columna adecuada para la aféresis, preferentemente una columna que es adecuada para el uso en una aféresis para eliminar anticuerpos que se pueden unir específicamente por el aptámero para su uso de acuerdo con la invención de una muestra líquida, preferentemente de un cuerpo fluido.

En un aspecto adicional, la presente invención se dirige al uso de un aptámero para su uso de acuerdo con la invención para la detección *in vitro* de anticuerpos, de forma similar, por ejemplo, autoanticuerpos, siendo específico del receptor acoplado a la proteína G, preferentemente los receptores adrenérgicos receptor alfa-1, receptor adrenérgico beta-1, receptor adrenérgico beta-2, receptor endotelina 1 ETA, receptor muscarínico M₂, receptor de la angiotensina II AT1, y/p receptores PAR. Dicho uso puede comprender el ensayo de una muestra en un ensayo de la frecuencia de un latido de cardiomiocito de rata en presencia y ausencia de una cantidad eficaz de un aptámero para su uso de acuerdo con la invención. Dependiendo del efecto de la muestra y del aptámero para su uso de acuerdo con la invención sobre la frecuencia del latido, la persona experta puede concluir la presencia de anticuerpos respectivos. Se pueden obtener también datos sobre el total o la cantidad relativa de dichos anticuerpos

en la muestra así como otras propiedades de los mencionados anticuerpos. El denominado ensayo de la frecuencia del latido del cardiomiocito de rata es un ensayo bien establecido para la detección y la caracterización de anticuerpos, por ejemplo, autoanticuerpos derivados de pacientes, específicos de numerosos receptores acoplados a la proteína G humana, similares por ejemplo al receptor alfa-1 adrenérgico humano, el receptor beta-1 adrenérgico, el receptor beta-2 adrenérgico, el receptor ETA de la endotelina 1, el receptor M₂ muscarínico, el receptor AT1 de la angiotensina II, y/o los receptores PAR. El ensayo se describe en detalle en Wallukat y col. (1987) Effects of the serum gamma globulin fraction of patients with allergic asthma and dilated cardiomyopathy on chromotropic beta adrenoceptor function in cultured neonatal rat heart myocytes, Biomed. Biochim. Acta 46, 634 639; Wallukat y col. (1988) Cultivated cardiac muscle cells a functional test system for the detection of autoantibodies against the beta adrenergic receptor, Acta Histochem. Suppl. 35, 145 149; y Wallukat y col. (2010) Distinct patterns of autoantibodies against G-protein coupled receptors in Chagas' cardiomyopathy and megacolon. Their potential impact for early risk assessment in asymptomatic Chagas' patients, J. Am. Coll. Cardiol. 55, 463 468. De esta manera, la persona experta es muy consciente de la naturaleza de este ensayo y sabe cómo aplicarlo.

El aptámero para su uso de acuerdo con la invención puede utilizarse concretamente en la detección y/o la caracterización de los anticuerpos respectivos, en el que los anticuerpos se presentan en o se derivan de un cuerpo fluido, preferentemente un fluido del cuerpo humano, más preferentemente de sangre humana, plasma, suero, orina, heces, fluido sinovial, fluido intersticial, linfa, saliva, sudor, fluido espinal y/o fluido lacrimal. En una realización preferida, el fluido corporal se toma de un individuo que padece o que es sospechoso de padecer una enfermedad autoinmunitaria. Preferentemente, la enfermedad autoinmunitaria es cardiomiopatía, cardiomiopatía dilatada (DCM), cardiomiopatía de periparto (PPCM), cardiomiopatía idiopática, cardiomiopatía de Chagas, megacolon de Chagas, mesoesófago de Chagas, neuropatía de Chagas, hiperplasia prostática benigna, esclerodermia, psoriasis, síndrome de Raynaud, preeclampsia, rechazo al aloinjerto de riñón, miocarditis, glaucoma, hipertensión, hipertensión pulmonar, hipertensión maligna, y/o enfermedad de Alzheimer. Incluso de forma más preferente, el término "enfermedad autoinmunitaria" o "enfermedades autoinmunitarias" se refiere a las enfermedades autoinmunitarias de cardiomiopatía dilatada (DCM), cardiopatía de periparto (PPCM), cardiomiopatía de Chagas, megacolon de Chagas, glaucoma, hipertensión, hipertensión pulmonar, hipertensión maligna, rechazo al injerto de riñón, síndrome de Raynaud y/o enfermedad de Alzheimer.

Para la detección y/o caracterización de dichos anticuerpos, el aptámero para su uso de acuerdo con la invención se puede usar en solución o en una forma inmovilizada.

El aptámero para su uso de acuerdo con la invención se puede usar para la detección directa o indirecta y/o la caracterización de dichos anticuerpos.

En lo sucesivo, la invención se explicará e ilustrará adicionalmente por medio de ejemplos.

Figuras:

La Figura 1 muestra las curvas de dosis respuesta de la neutralización de la actividad funcional de diferentes AAB como se ha indicado en la figura.

La Figura 2 muestra la influencia de la presencia IgG-3 [73 nM] humana sobre la curva dosis-respuesta que neutraliza la actividad funcional del receptor beta1 de los AAB mediante el aptámero de trombina.

La Figura 3 muestra la influencia del aptámero-trombina sobre la disminución mediada por ETA-AB de la frecuencia del latido de cardiomiocitos de neonatos.

La Figura 4 muestra la unión aptámero-trombina (SEQ. ID No. 1) sobre ETA-AB inmovilizada, las subclases de IgG de conejo inmovilizada y de IgG humana inmovilizada para el control. A y C: 25 nM de cada proteína inmovilizada, B y D: 250 nM de las proteínas inmovilizadas. A y B: unión del aptámero-trombina de la SEQ. ID No. 1 y C y D: unión de su secuencia control mezclada. Se usó el aptámero-trombina biotinilado, y el resto de biotina sirvió para la detección. Se cuantificó la cantidad de biotina unida mediante NeutravidinaPOD y la reacción TMB/H₂O₂.

La Figura 5 muestra la unión de la ETA-AB (SP 4122P) sobre el aptámero-trombina inmovilizado (SEQ. ID No. 1) A: 1 μM de B: 0.1 μM trombina-aptámero para la inmovilización. Para la detección se usó el anticuerpo POD secundario dirigido contra IgG de conejo (1:10.000) y la reacción TMB/H₂O₂. La placa no revestida y la placa revestida con neutravidina sirvieron para el control. (Neutravidina = NA).

La Figura 6 muestra la unión de la ETA-AB (SP 4122P) sobre el aptámero-trombina inmovilizado (SEQ. ID No. 1) y el aptámero-trombina mezclado inmovilizado para el control.

La Figura 7 muestra la recuperación de ETA-AB unida tras la elución de la columna de trombina aptámero y el correspondiente experimento control (columna control). Se midió la actividad ETA_AB en el bioensayo.

La Figura 8 muestra la recuperación de ETA-AB procedente del suero enriquecido en el experimento ELISA. A: muestra la curva estándar de ETAAB que se ha tratado de forma comparable con las muestras de

eluato (diálisis). B: muestra la cantidad de ETA-AB recuperada en el flujo pistón, la solución de lavado y los eluatos tras la elución de la columna trombina-aptámero (columna ARC183) y la correspondiente columna control (trombina aptámero mezclados). Para la detección sirvió el anticuerpo POD dirigido contra IgG de conejo (1:10.000) y la detección de TMB/H₂O₂.

- 5 **La Figura 9** muestra el ensayo de capacidad de neutralización de AAB de la trombina-aptámero marcado con 5'-FITC usando el bioensayo de cardiomiocitos de ratas neonatas que laten espontáneamente. El aumento de la frecuencia del latido producido por el receptor beta 1 de AAB se redujo en aproximadamente el 50 % cuando estuvieron presentes 100 nM de FITC-trombina-aptámero. Las barras son el promedio de dos experimentos independientes (n=2).
- 10 **La Figura 10** muestra la detección de ETA-AAB de una muestra del paciente utilizando un ensayo de tipo sándwich de trombina-aptámero // FITC-trombina-aptámero. Para el control sirvió una muestra IgG del control y trombina-aptámero mezclados. Los datos son de un experimento. (FITC-throm-a = FITC-trombina-aptámero, throm-apta = trombina-aptámero).
- 15 **La Figura 11** muestra la neutralización de la actividad de AAB (receptor beta1 de AAB, alfa1 + receptor beta2 de AAB, receptor beta2 de AAB purificado por afinidad, cada AAB n=1) por 100 nM de dT-trombina-aptámero, medido en el bioensayo de cardiomiocitos neonatales que laten espontáneamente.
- 20 **La Figura 12** muestra el ensayo de la funcionalidad de la secuencia de trombina-aptámero truncada (secuencia de 12-mer, SEQ ID No. 3, Throm K1) en comparación con la secuencia 15-mer original (ARC183, SEQ ID No. 1) y la secuencia 26-mer (NU172, SEQ ID No. 2) que neutraliza la actividad cronotrópica positiva del receptor beta1 de los AAB en el bioensayo de los cardiomiocitos de rata que laten espontáneamente.

Ejemplos:

Sumario

25 Los aptámeros que consisten en la secuencia de ácido nucleico con la SEQ. ID No. 1 y 2, respectivamente, son aglutinantes afines y específicos de los autoanticuerpos que se dirigen a los receptores acoplados a la proteína G. Los aptámeros son capaces de neutralizar la función AAB (autoanticuerpo) en el estado soluble. Inmovilizados sobre superficies, los aptámeros son capaces de capturar AAB. Una elución siguiente eliminará los AAB capturados.

30 Se ha mostrado, por lo tanto, que los aptámeros para su uso de acuerdo con la presente invención son moléculas adecuadas para fines terapéuticos y diagnósticos para el tratamiento de enfermedades que se asocian con los AAB activos funcionales contra los receptores acoplados a la proteína G.

Material y procedimientos

Preparación y cultivo de cardiomiocitos

35 Se extrajeron los corazones de ratas de 1 a 3 días de edad en condiciones estériles y se transfirieron a solución salina tamponada con fosfato (PBS) que contenía penicilina/estreptomicina. Se separó el tejido del ventrículo, se diseccionó en piezas y se lavó dos veces con 10 ml de PBS que contenía penicilina/estreptomicina y al final una vez con PBS sólo. Las piezas del ventrículo se suspendieron en 30 ml de PBS que contenían 0,2 % de tripsina. Tras la incubación durante 20 min a 37 °C, se detuvo la tripsinización con 10 ml de suero de ternera inactivado térmicamente frío en hielo. La suspensión resultante se centrifugó a 130 x g durante 6 min y a continuación se transfirió el aglomerado a 20 ml de medio SM20-I. Para la estimación del recuento de células, se añadieron 100 µl de esta suspensión a 100 µl de solución de azul tripán. Para el cultivo de células, se suspendieron 2,4x 10⁶ células en 2,5 ml de medio SM 20-I que contenía glucosa que se equilibró con aire húmedo y se suplementó con 10 % de suero de ternera inactivado térmicamente, 0,1 mU de insulina, y 2 µM de fluorodesoxiuridina (evitando el crecimiento en exceso de los miocitos por no miocitos), se transfirieron a matraces Falcon de 12,5-cm² y se cultivaron como monocapas durante 4 días a 37 °C. El medio se renovó después de dos días.

Principio del bioensayo

45 Para la identificación y la cuantificación del AAB, se utilizó un bioensayo que se estableció en primer lugar para la medición del AAB frente a los receptores acoplados a la proteína G por Wallukat y Wollenberger (Wallukat G, Wollenberger A. Effects of the serum gamma globulin fraction of patients with allergic asthma and dilated cardiomyopathy on chromotropic beta adrenoceptor function in cultured neonatal rat heart myocytes. Biomed Biochim Acta 1987;46:S634-9) y que los inventores describen recientemente en detalle para la medición del AAB frente a los receptores beta 1 y beta 2 adrenérgicos y los receptores M2 muscarinérgicos en la enfermedad de Chagas crónica (Wallukat G, Munoz Saravia SG, Haberland A, Bartel S, Araujo R, Valda G, Duchon D, Diaz Ramirez I, Borges AC, Schimke I. Distinct patterns of autoantibodies against G-protein-coupled receptors in Chagas' cardiomyopathy and megacolon. Their potential impact for early risk assessment in asymptomatic Chagas' patients. J Am Coll Cardiol. 2010; 55:463-8).

55

En este bioensayo, se registró la respuesta cronotrópica de los cardiomiocitos de rata neonatales cultivados que laten espontáneamente que es la suma de la cronotropía positiva producida por los AAB estimulantes tales como los que se dirigen a los receptores beta 1 y beta 2 o el receptor alfa1 adrenérgico y la cronotropía negativa originada inhibiendo los AAB tales como los receptores directores M2 muscarigénicos o el receptor de la endotelina de tipo A (receptor ETA) (1 unidad de actividad AAB = 1 cambio de frecuencia de un latido/min).

Para diferenciar las especies de AAB con respecto a su contribución a la respuesta cronotrópica (cronotropía positiva o negativa), se llevó a cabo el análisis en presencia de antagonistas específicos tales como ICI-118.551 para el receptor beta2 de AAB, atropina para M2-AAB, propranolol para el receptor beta1/beta2 de AAB, BQ 610 o BQ 123 para el receptor ETA-receptor, prazosina para el adrenoceptor alfa1 e lbesartan o Losartan para el receptor AT1. El cambio de actividad restante está producido por AAB excepto una vez que se bloqueó específicamente. Se llevó a cabo una caracterización adicional de diferentes AAB receptores demostrados anteriormente utilizando los péptidos que representan los epítomos de AAB que corresponden a los bucles extracelulares de los receptores.

El bioensayo puede detectar y cuantificar todos los AAB séricos humanos y otras moléculas que dirigen receptores sobre la superficie celular cuyas secuencias son homólogas a los receptores humanos (en el caso de los AAB directores) y que se unen a una maquinaria que regula la frecuencia del latido (contractilidad, cronotropía) de las células tales como el sistema de la proteína G.

Preparación de muestras de suero para la identificación y diferenciación de AAB y la medida de la actividad de AAB

1 ml de suero control y del paciente y 660 µl de solución saturada de sulfato de amonio se mezclaron (concentración final, sulfato de amonio al 40 %) y se incubaron durante 18 horas a 4 °C. Tras la centrifugación durante 15 min a 6.000 x g, el aglomerado se volvió a suspender en 750 µl de PBS, se mezcló con 750 µl de solución saturada de sulfato de amonio (concentración final de sulfato de amonio al 50 %) y se centrifugó de nuevo. Después de esto, el aglomerado se suspendió en 700 µl de PBS y se dializó frente a un volumen de 100 veces de PBS. La fracción de IgG resultante se puede almacenar a -20 °C hasta la medición.

Resultados

Inhibición de la funcionalidad de AAB de diferentes receptores acoplados a la proteína G por aptámeros específicos

A continuación, se investigó la neutralización de la actividad de anticuerpos (autoanticuerpos de suero de paciente) por el aptámero de la SEQ. ID No.1 (conocida también como trombina-aptámero de la SEQ ID No.1, o ARC 183, descrito en el documento US 5.543.293) y por el aptámero de la SEQ. ID No. 2 (conocido también como trombina-aptámero de la SEQ ID No. 2, o ARC 2172 o NU 172, descrito en el documento WO/2007/025049) (**Tabla 1**).

Haciendo esto, se investigaron los siguientes anticuerpos (autoanticuerpos = AAB): el receptor alfa 1 adrenérgico de AAB, el receptor beta1 adrenérgico de AAB, el receptor beta2 de AAB, el receptor M₂ muscarínico de AAB, el receptor ETA de la endotelina 1 de AAB (ETA-AAB), el receptor AT1 de la angiotensina II de AAB, y el receptor PAR de AAB.

Se ha descrito la incidencia de dicho AAB en las siguientes situaciones patológicas, no excluyendo otras situaciones patológicas que pueden ser también transportadores de los mismos o similares AAB: DCM, cardiomiopatía de Chagas, enfermedad de Chagas crónica, megacolon de Chagas, cardiomiopatía de periparto, glaucoma, hipertensión pulmonar, hipertensión, hipertensión maligna, diabetes mellitus, enfermedad de Alzheimer, rechazo al aloinjerto de riñón, síndrome de Raynaud. La **Tabla 1** muestra que la actividad funcional de todos los autoanticuerpos analizados dirigidos contra los receptores acoplados a la proteína G se neutralizaron usando el aptámero de la SEC ID No. 1 o se neutralizaron parcialmente usando el aptámero de la SEQ ID No. 2.

Tabla 1 Muestra la capacidad de los aptámeros de las SEQ ID No. 1 y SEQ ID No. 2 [100 nM] sobre la neutralización de la capacidad funcional de los AAB dirigidos contra los receptores acoplados a proteína G. La actividad funcional de los ABB se midió mediante su capacidad de cambiar la velocidad de pulso de las células [Δ frecuencia cardiaca / 15 s]

Enfermedad	Tipo AAB	Bucle	Purificado por afinidad		Sin aptámero	+ Trombina-aptámero (SEQ ID No,1)	+ mezcla de aptámero	+ Trombina-aptámero (SEQ ID No,2)
DCM	Receptor beta 1-AAAB	1, Bucle		Paciente 1	6,33	-0,17		
	Receptor beta 1-AAAB	2, Bucle		Paciente 2	5,33	0,5		
Glaucoma	Receptor beta 2-AAAB	2, Bucle	Afinidad	Paciente 1	5,33	0,17	5,33	
				Paciente1	7,33	0,33		5,33
				Paciente2	8,67	-0,17		
				Paciente 3	6,0	0,67		
Cardiomiopatía periparto	Receptor beta 1-AAAB	2, Bucle	Afinidad	Paciente 4	7,67	-0,17		
	Receptor alfa 1-AAAB	2, Bucle		Paciente 1	6,33	0,5		4,0
Hipertensión pulmonar	Receptor alfa 1-AAAB	2, Bucle		Paciente1	5,5	-0,17		
	Receptor endotelina-AAB	2, Bucle		Paciente2	5,17	0,33		2,0
Hipertensión	Receptor alfa 1-AAAB	2, Bucle	Afinidad	Paciente1	-4,83	-0,17		
	Receptor AT1 1-AAAB	2, Bucle		Paciente2	-4,8	0,33		2,0
Hipertensión maligna	Receptor beta 2-AAAB	2, Bucle	Afinidad	Paciente1	5,5	1,0		3,33
	Receptor beta 2-AAAB	2, Bucle		Paciente2	6,33	-0,83		
Megacolon de Chagas	Receptor beta 2-AAAB	2, Bucle	Afinidad	Paciente1	7,83	0,67		
	Receptor beta 2-AAAB	2, Bucle		Paciente1	6,17	-0,5		2,0

(Continuación)

Enfermedad	Tipo AAB	Bucle	Purificado por afinidad	Paciente	Sin aptámero	+ Trombina-aptámero (SEQ ID No.1)	+ mezcla de aptámero	+ Trombina-aptámero (SEQ ID No.2)
Cardiomiopatía de Chagas	Receptor beta 1-AAB	2, Bucle		Paciente 2	3,5	0,5		3,0
	Receptor M2 1-AAB	2, Bucle		Paciente 2	-3,67	0,5		3,0
Transplante riñón	Receptor ATI 1-AAB	2, Bucle	Afinidad	Paciente 1	6,17	0,17		
	Receptor alfa 1-AAB	2, Bucle		Paciente 1 Paciente 2	3,97 5,5	0,0 0,33		
Enfermedad de Alzheimer	Receptor alfa 1-beta 1-AAB	2, Bucle		Paciente 1	8,0	0,0		
	Receptor beta 2-AAB	1, Bucle	Afinidad	Paciente 2	4,67	0,67		
Síndrome de Raynaud	Receptor ETA-AAB			Paciente 1	-5,17	0,33, 0,0,		
	Receptor PARR-AAB			Paciente 1 Paciente 2	7,33 4,67	0,17 0,33, 0,0		

Curvas de dosis-respuesta de la trombina-aptámero mediada por la neutralización de AAB

A continuación se midieron las curvas de dosis-respuesta de las incubaciones individuales de trombina-aptámero (**Fig. 1**). Haciendo esto no solo se neutralizaron los receptores acoplados a la proteína G frente a los AAB, sino también el receptor beta1 de los AAB procedentes de la sangre de las ratas SHR. De hecho, se neutralizaron los AAB humanos dirigidos contra el primer o segundo bucle del receptor beta1, los AAB dirigidos contra el receptor AT1, y el receptor alfa1 adrenérgico. El receptor beta1 de AAB en ratas es un AAB formado espontáneamente.

Se hizo evidente que diferentes curvas de dosis-respuesta mostraron ligeras diferencias. Aunque el efecto de neutralización fue más eficaz para el receptor alfa1 del AAB humano, este mostró la eficacia más pequeña para el receptor beta 1 del AAB. Dado que la concentración de AAB debe ser de alrededor de 0,1 % de la fracción de IgG (información personal del Dr. Wallukat) que las concentraciones de aptámero diferentes arrostrarían una concentración final de aproximadamente 1,4 nM de AAB (concentración de IgG normal de aproximadamente 10 g/l = 68,5 µM, dilución de AAB en el medio de cultivo celular 1:50). Resulta muy lógico que el efecto de neutralización comience con algún AAB, tal como el receptor alfa 1 de AAB a una concentración de aptámero de aproximadamente 1 nM, mientras que en general son necesarios 100 nM de aptámero para la inhibición completa de la funcionalidad de AAB.

Afinidad del aptámero de AAB en presencia de IgG-3 humana competitiva

Los experimentos iniciales que prueban la afinidad de la trombina-aptámero de la SEQ ID No. 1 hacia los subtipos de IgG humana han mostrado que la trombina-aptámero de la SEQ ID No. 1 tenía una mayor afinidad hacia la IgG-3 seguida por IgG-4, IgG-2, y IgG1. Aunque las diferencias entre los últimos tres subtipos fueron solo marginales, la afinidad hacia el subtipo IgG-3 fue sorprendente (no se muestran los datos).

Ahora, a fin de probar, si la afinidad de la trombina-aptámero de la SEQ ID No. 1 hacia el AAB es mayor en comparación con su afinidad común hacia la subclase IgG-3, se llevó a cabo el siguiente experimento de competición: midiendo a la vez la curva de dosis-respuesta de la trombina-aptámero de la SEQ ID No. 1 frente a un AAB de suero de paciente humano (receptor beta-1 del AAB, segundo bucle, dilución 1:50), en un conjunto experimental, se añadieron 73 nM de IgG-3 humana permitiendo competir con el receptor beta1 de AAB alrededor de la unión de trombina-aptámero (**Fig. 2**). Especialmente a la baja concentración de la trombina aptámero de la SEQ ID No.1 (1, 5, y 10 nM de trombina-aptámero) a la cual la concentración de IgG-3 está claramente en el exceso molar de la trombina-aptámero, no se observaron diferencias entre los efectos de neutralización del AAB, con y sin la presencia de IgG-3.

Demostración de la unión entre la trombina-aptámero y el autoanticuerpo utilizando un modelo de autoanticuerpo: anticuerpo de conejo dirigido contra el receptor de la endotelina humana contra el segundo bucle extracelular del receptor (anticuerpos acris, SP 41222P)

1. Prueba de funcionalidad de EIA-AB en el bioensayo y la neutralización por la trombina-aptámero de la SEQ ID No.1

Se generó el anticuerpo receptor de la endotelina de conejo (ETA-AB) contra el segundo bucle extracelular del receptor de la endotelina humana. El anticuerpo mostró actividad funcional en el bioensayo. El ETA-AB produjo una reducción de la frecuencia del latido de los cardiomiocitos de rata neonatales que laten espontáneamente (**Fig. 3**). La adición de 100 nM de trombina aptámero produjo la neutralización completa de este ETA-AB que produjo un cambio en la frecuencia del latido (**Fig. 3**). La adición de la trombina-aptámero (SEQ No. 1) solo sobre los cardiomiocitos de rata neonatales no produjo ningún efecto visual sobre las células ni tuvo influencia sobre la frecuencia basal del latido (no se muestran los datos).

2. Ensayo de la unión directa entre la trombina aptámero de la SEQ ID No.1 y el EIA-AB

Se probó el ensayo de la unión directa entre la trombina-aptámero y el ETA-AB en el experimento ELISA de dos montajes experimentales diferentes. En primer lugar, se inmovilizó el ETA-AB sobre la placa del ELISA y se ensayó su capacidad para unirse a la trombina-aptámero de la SEQ ID No.1 (**Fig. 4**). En un segundo conjunto de experimentos, se inmovilizó la trombina-aptámero de la SEQ ID No.1 y se ofreció el ETA-AB para la unión (**Fig. 5**).

Para el primer conjunto de experimento, se seleccionaron dos concentraciones diferentes de proteínas para la inmovilización sobre la placa de ELISA: 25 nM (**Fig. 4A**) y 250 nM (**Fig. 4B**). Para el control sirvió una IgG de conejo, subtipos de IgG humana (IgG-1,2,3 y 4) a las mismas concentraciones, y la placa de plástico sin revestir. Un control adicional era la secuencia de trombina-aptámero mezclada que se ofreció para la unión (**Fig. 4C,D**).

Un segundo conjunto de experimentos probó la unión entre el ETA-AB y la trombina-aptámero de la SEQ. ID No. 1 en un experimento inverso. Ahora, la trombina-aptámero biotinilada se inmovilizó sobre las placas de ELISA mediante la preinmovilización de neutravidina. Después, se ofreció el ETA-AB para la unión (**Fig. 5 A,B**).

En comparación, la extinción entre la **Fig. 5B** y **5A** muestra que un revestimiento de 0,1 µM de trombina-aptámero (SEQ. ID No. 1) alcanzó ya la saturación en el experimento dado.

Un control adicional era la unión del ETA-AB sobre la trombina-aptámero mezclada inmovilizada (**Fig. 6**).

La afinidad del ETA-AB hacia la trombina-aptámero mezclada era aproximadamente del 50 % de la afinidad alcanzada si la trombina-aptámero (SEQ. ID No. 1) estaba disponible para la unión.

Columna de trombina aptámero para la eliminación del AAB procedente de suero

5 **1 suero humano enriquecido con EIA-AB de conejo**

A continuación, se preparó una columna de trombina-aptámero que sirvió para la eliminación del AAB del suero. Para el control sirvió una columna que llevaba la trombina-aptámero mezclada.

Los aptámeros (trombina-aptámero de la SEQ ID No. 1) y la secuencia control mezclada se unieron sobre el material de la columna (NHS activado con sefarosa, GE healthcare) a una concentración de 0,1 μmol. En un primer conjunto de experimentos se enriqueció suero con el ETA-AB de conejo (50 nM) a fin de obtener la posibilidad no solo de medir la actividad de ETA-AB mediante el bioensayo (**Fig. 7**) si no también mediante un ELISA (**Fig. 8**). Se administraron los sueros enriquecidos sobre la columna y la columna de control. Se capturó y se almacenó el flujo a su través. Los ETA-AB se eluyeron utilizando una solución de KSCN 3 M. Antes de medir la actividad del AAB en los eluatos, se dializaron las muestras frente a tampón fisiológico durante 3 días a 4 °C. En el bioensayo, se midieron los eluatos, que se capturaron en dos fracciones (**Fig. 7**). Aunque la columna de trombina-aptámero mostró la actividad de ETA-AB tras la elución, la columna no. La principal fracción de ETA-AB estaba en la segunda fracción del eluato que fue acreedora de los volúmenes utilizados. El volumen de la columna era de 500 μl mientras que se seleccionaron 250 μl para todas las etapas de manipulación.

Para la detección del ETA-Ab en el flujo pistón o el eluato de las columnas en el ELISA, la curva estándar del ETA-AB del ELISA tenía también que experimentar el procedimiento de idealización, comparable al material del eluato-muestra (**Fig. 8A**). Usando este material normalizado, se ensayaron las muestras para la presencia de ETA-AB (**Fig. 8B**).

Se muestra que solo la columna específica de trombina-aptámero era capaz de unir el ETA-AB del suero del control enriquecido, mientras que el aptámero del control mezclado no se une a ETA-AB. Aquí, se encontró el ETA-AB en el flujo pistón aunque la columna específica con las fracciones del eluato contenía el ETA-AB.

Solo para excluir que la IgG humana unida procedente del suero del control puede, mediante reacción cruzada con el anticuerpo secundario imitar la presencia de ETA-AB, se aplicó también suero (40 % y 100 %) sobre la placa de ELISA. Se midió la cantidad posible máxima de reacción cruzada, que era más pequeña que la detección del AB específico dirigido contra la IgG de conejo. Además, se mostró en experimentos independientes que los eluatos contenían menos de 1/10 de la IgG humana en comparación con las muestras del flujo pistón (no se muestran los datos) excluyendo una enorme influencia de reactividad cruzada del anticuerpo secundario.

2. suero que contiene AAB humano

En una segunda serie de experimentos, se usó la columna de trombina-aptámero para la eliminación del AAB del suero. Para el control sirvió la columna de trombina-aptámero mezclada.

35 Para este fin, se proporcionaron 250 μl desuero que contenía ETA-AAB y receptor alfa-1 de AAB sobre las columnas. Se capturaron el flujo pistón y los eluatos y se estimó la actividad de AAB usando el bioensayo (**lab. 2**). Se llevó a cabo la elución con KSCN 3 M. Las muestras se dializaron frente a un tampón fisiológico durante 3 días antes de que se llevara a cabo la medición de la actividad de AAB.

40 **Tabla 2** Medición de ETA-ABB y la actividad del alfa1-receptor ABB del suero humano en las fracciones individuales del experimento de columna

Disminución/aumento en el número de latidos [latidos/15 s]		Columna trombina-aptámero	Columna de control (trombina-aptámero mezclado)
Flujo pistón	Receptor alfa 1 AAB	-0,17	6,17
	Receptor endotelina AAB	-0,17	4,17
1 ^{er} eluato	Receptor alfa 1 AAB	2,0	0,17
	Receptor endotelina AAB	-1,83	0,17
1 ^{er} eluato	Receptor alfa 1 AAB	4,67	-0,17
	Receptor endotelina AAB	-2,5	-0,17

(Continuación)

Disminución/aumento en el número de latidos [latidos/15 s]		Columna trombina-aptámero	Columna de control (trombina-aptámero mezclado)
1 ^{er} eluato	Receptor alfa 1 AAB	1,0	-0,17
	Receptor endotelina AAB	-0,5	-0,17

n.d. = no determinado

Posible kit para la purificación del suero procedente de AAB mediante perlas magnéticas de aptámero

Un kit tanto para la purificación del suero procedente AAB o para el enriquecimiento de AAB mediante perlas magnéticas de trombina-aptámero.

5

Tabla 3 Unión de suero AAB (ser humano y rata) en aptámero-trombina (SEQ ID NO. 1; perlas magnéticas de estreptavidina y trombina-aptámero biotinilado)

Delta latidos / 15 s	Trombina-apta (SEQ ID No. 1) ABB β1-humano	Trombina-mezcla (SEQ ID No. 1) ABB β1-humano	Trombina-apta (SEQ ID No. 1) SHR-rata
Sobrenadante partículas	0	5,5	0
1. Solución lavado	0	n.d.	0
1^{er} eluato	5,67 (receptor beta 1 AAB)	1,0 (1 ^{er} y 2 ^o eluato combinados)	4,67 (receptor beta 1 AAB) -1,83 (receptor M2-AAB)
2^o eluato	2,5 (receptor beta 1 AAB)		2,5 (receptor beta 1 AAB) -2,83 (receptor M2-AAB)

Introducción de la protección de la exonucleasa

10 A continuación se probó la influencia de la introducción de una protección 3'-dT sobre la actividad funcional de la SEQ. ID No. 1. Se cree que una protección 3'-dT protege la secuencia nucleotídica de la actividad exonucleasa y aumenta su estabilidad en los fluidos biológicos. Se utilizó en del efecto sobre la protección 3'-dT sobre la funcionalidad del aptámero del receptor beta1 de AAB (bucle 2) procedente de un paciente con DCM y el receptor beta 2 de AAB procedente de un paciente con Alzheimer (Tab 4). Se neutralizó la actividad funcional de ambos AAB
15 cuando se incubó con 100 nM de aptámero modificado con la protección 3'-dT. La modificación de la protección 3' no afecta la actividad funcional del aptámero de la SEQ. ID No. 1.

El aptámero protegido con la PROTECCIÓN no afecta solo la velocidad basal del latido de los cardiomiocitos neonatales.

20 **Tabla 4** Medición en un bioensayo de la actividad cronotrópica del ABB en suero [delta latidos / 15 s] de los AAB tratados con trombina-aptámero de SEQ ID No. 1 modificado mediante 3'-dT-cap o no (sin aptámero).

Enfermedad	Tipo AAV	Sin aptámero	+ aptámero-3'-dT protegido
DCM	Receptor beta 1 AAB	6,0	0,0
Alzheimer	Receptor beta 2 AAB	5,17	0,0

Trombina-aptámero marcado con FITC para la detección de los AAB

Uso de trombina-aptámero marcada directamente con un marcador de fluorescencia para la detección de los AAB séricos

25 El objetivo de estos experimentos es la generación de un aptámero marcado directamente que se dirige a los autoanticuerpos contra los receptores acoplados a la proteína G que se explicarán, al final, para la detección de

dichos AAB.

Para este fin, la trombina-aptámero se marcó en el extremo 5' de FITC.

Se ensayó en los primeros experimentos, si la trombina-aptámero marcada con FITC mostró la funcionalidad/actividad completa para neutralizar los autoanticuerpos en comparación con su versión no marcada. Esto se probó esto usando el bioensayo.

La **Fig. 9** muestra la capacidad de 100 nM de la trombina-aptámero de 5'-FITC para neutralizar el receptor beta 1 de AAB. La marca FITC redujo la actividad de la trombina-aptámero, pero el 50 % de la actividad del receptor beta 1 de AAB se neutralizó aún a esta concentración seleccionada de 100 nM. Se observó una inhibición parcial de la actividad de AAB a esta concentración del aptámero.

Debido a que la trombina-aptámero marcada con FITC si se compara con el aptámero no marcado a la misma concentración una inhibición parcial de la actividad de AAB, se capturó la molécula para probar, si sería una estrategia posible utilizar esta trombina-aptámero marcada para un ensayo de tipo sándwich. Por este motivo, la trombina-aptámero biotinilada no marcada se inmovilizó sobre la placa de ELISA mediante la neutravidina y sirvió para capturar los AAB a la vez que se suponía que la antitrombina-aptámero marcada con FITC sirve al final de la detección del material de AAB adsorbido.

Las muestras se retiraron de los pocillos, los duplicados se unificaron (volumen final de 200 µl) y se diluyeron con 300 µl de PBS y se midió la fluorescencia relativa utilizando el espectrofluorofotómetro RF-5001PC (Shimadzu, Japón) usando la longitud de onda de excitación y emisión de 494 nm y 519 nm, respectivamente.

Como se puede observar de la **Fig. 10** era posible detectar una muestra del paciente (fracción IgG que contiene los ETA-AAB) en comparación con la muestra de IgG del control. Utilizando la trombina-aptámero mezclada como un control adicional no muestra también ninguna fluorescencia.

Influencia de la protección dT sobre la funcionalidad de la trombina-aptámero

En los siguientes experimentos se ensayó si sería posible la introducción de un grupo protector tal como la protección dT para la protección de la actividad exonucleasa, sin influenciar los anticuerpos neutralizantes de la actividad trombina-aptámero frente a los receptores acoplados a la proteína G. La introducción de una protección dT era posible sin influenciar la funcionalidad de la trombina aptámero para neutralizar los AAB frente a los receptores acoplados a la proteína G (Fig. 11).

Truncamiento de la trombina-aptámero que da como resultado la secuencia de 12mer

En un siguiente conjunto de experimentos se probó si un truncamiento de la trombina-aptámero daría como resultado productos que son todavía capaces de neutralizar autoanticuerpos contra los receptores acoplados contra la proteína G. La secuencia de 15-mer de la trombina-aptámero (ARC183) se truncó, por tanto, en una secuencia de 12-mer con la SEQ ID No. 3, denominada Throm-K1. Se probó la secuencia truncada para su capacidad de neutralizar los AAB en el bioensayo (demostrado por el receptor beta1 de los AAB, **Fig. 12**).

La secuencia de 12-mer mostró una actividad completa.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Charite Universitätsmedizin Berlin Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin

<120> Uso de aptámeros en el tratamiento y/o el diagnóstico de enfermedades autoinmunitarias

<130> P08553WO

<150> EP 11 157 229.3

<151> 07-03-2011

<160 > 3

<170> PatentIn versión 3.5

<210 > 1

<211 > 15

<212> ADN

<213> artificial

<220>

<223> aptámero de la secuencia 1

<400> 1
ggttggtgtg gttgg 15

5 <210 > 2
<211 > 26
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> aptámero de la secuencia 2

10 <400> 2
cgcctagggt ggtaggggtg gtggcg 26

<210 > 3
<211 > 12
<212> ADN
<213> artificial

15 <220>
<223> 12-mero truncado de la SEQ ID No. 1

<400> 3
ggttggtgtg gt 12

REIVINDICACIONES

1. Aptámero que comprende una secuencia del ácido nucleico de la SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 2, SEQ ID No. 3 y/o una secuencia de ácido nucleico que es al menos un 80 % idéntica a una de la SEQ ID No. 1, 2 y 3 para su uso en el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias interfiriendo con la interacción de autoanticuerpos específicos de los receptores acoplados a la proteína G asociados con enfermedades autoinmunitarias, en el que la enfermedad autoinmunitaria es cardiomiopatía, cardiomiopatía dilatada (DCM), cardiomiopatía de periparto (PPCM), cardiomiopatía idiopática, cardiomiopatía de Chagas, megacolon de Chagas, megaesófago de Chagas, neuropatía de Chagas, hiperplasia prostática benigna, esclerodermia, psoriasis, síndrome de Raynaud, preeclampsia, rechazo al aloinjerto de riñón, miocarditis, glaucoma, hipertensión, hipertensión pulmonar, hipertensión maligna y/o enfermedad de Alzheimer, y en el que el aptámero se une específicamente y con elevada afinidad a dichos autoanticuerpos.
2. Aptámero que comprende o consiste en la secuencia del ácido nucleico de la SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 2, SEQ ID No. 3 y/o una secuencia de ácido nucleico que es al menos un 80 % idéntica a una de la SEQ ID No. 1, 2 y 3 para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el aptámero es para uso como ingrediente selectivo durante la aféresis terapéutica de la sangre o sus constituyentes de un paciente que padece una enfermedad autoinmunitaria asociada con la presencia de autoanticuerpos específicos de un receptor acoplado a la proteína G, en el que los autoanticuerpos están presentes en el suero de un paciente que padece dicha enfermedad autoinmunitaria, en la que la enfermedad autoinmunitaria es cardiomiopatía, cardiomiopatía dilatada (DCM), cardiomiopatía de periparto (PPCM), cardiomiopatía idiopática, cardiomiopatía de Chagas, megacolon de Chagas, megaesófago de Chagas, neuropatía de Chagas, hiperplasia prostática benigna, esclerodermia, psoriasis, síndrome de Raynaud, preeclampsia, rechazo al aloinjerto de riñón, miocarditis, glaucoma, hipertensión, hipertensión pulmonar, hipertensión maligna y/o enfermedad de Alzheimer.
3. Aptámero para uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en el que el aptámero se usa en el tratamiento de un ser humano.
4. Aptámero para el uso de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, en el que el aptámero es un aptámero de ADN.
5. Aptámero para uso de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, en el que el aptámero consiste de la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 2, SEQ ID No. 3 o una secuencia de ácido nucleico que es al menos un 80 % idéntica a una de la SEQ ID No. 1, 2 y 3.
6. Composición farmacéutica que comprende un aptámero de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 5 y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable para su uso en el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias interfiriendo con la interacción de autoanticuerpos específicos de los receptores acoplados a la proteína G asociados con enfermedades autoinmunitarias, en la que la enfermedad autoinmunitaria es cardiomiopatía, cardiomiopatía dilatada (DCM), cardiomiopatía de periparto (PPCM), cardiomiopatía idiopática, cardiomiopatía de Chagas, megacolon de Chagas, megaesófago de Chagas, neuropatía de Chagas, hiperplasia prostática benigna, esclerodermia, psoriasis, síndrome de Raynaud, preeclampsia, rechazo al aloinjerto de riñón, miocarditis, glaucoma, hipertensión, hipertensión pulmonar, hipertensión maligna y/o enfermedad de Alzheimer.
7. Kit que comprende al menos un aptámero de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 5 y un recipiente para su uso en el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias interfiriendo con la interacción de autoanticuerpos específicos de los receptores acoplados a la proteína G asociados con enfermedades autoinmunitarias, en el que la enfermedad autoinmunitaria es cardiomiopatía, cardiomiopatía dilatada (DCM), cardiomiopatía de periparto (PPCM), cardiomiopatía idiopática, cardiomiopatía de Chagas, megacolon de Chagas, megaesófago de Chagas, neuropatía de Chagas, hiperplasia prostática benigna, esclerodermia, psoriasis, síndrome de Raynaud, preeclampsia, rechazo al aloinjerto de riñón, miocarditis, glaucoma, hipertensión, hipertensión pulmonar, hipertensión maligna y/o enfermedad de Alzheimer.
8. Uso de un aptámero como se define en una de las reivindicaciones 1 a 5 para la detección *in vitro* de un anticuerpo que es específico de un receptor acoplado a la proteína G, preferentemente el receptor acoplado a proteína G humano receptor alfa-1 adrenérgico, el receptor beta-1 adrenérgico, el receptor beta-2 adrenérgico, el receptor ETA de la endotelina 1, el receptor M₂ muscarínico, el receptor AT1 de la angiotensina II y/o los receptores PAR.
9. Uso de la reivindicación 8, en el que el anticuerpo a detectar es un autoanticuerpo.
10. Uso de la reivindicación 8 o 9, en el que el anticuerpo está presente en, o se deriva de, un fluido corporal, preferentemente un fluido de un cuerpo humano, más preferentemente de sangre humana, plasma, suero, orina, heces, fluido sinovial, fluido intersticial, linfa, saliva, fluido espinal y/o fluido lacrimal.
11. Uso de la reivindicación 10, en el que el fluido corporal se toma de un individuo que padece o se sospecha que padece una enfermedad autoinmunitaria, preferentemente una enfermedad autoinmunitaria asociada con la presencia en el suero del paciente de autoanticuerpos específicos de un receptor acoplado a la proteína G, más

preferentemente, enfermedades autoinmunitarias asociadas con la presencia en el suero del paciente de autoanticuerpos específicos del receptor alfa-1 adrenérgico, el receptor beta-1 adrenérgico, el receptor beta-2 adrenérgico, el receptor ETA de la endotelina 1, el receptor M₂ muscarínico, el receptor AT1 de la angiotensina II y/o los receptores PAR.

5

Curva dosis-respuesta:
 SEQ No.1 trombina-aptámero / receptor AAB diferente (1:50)

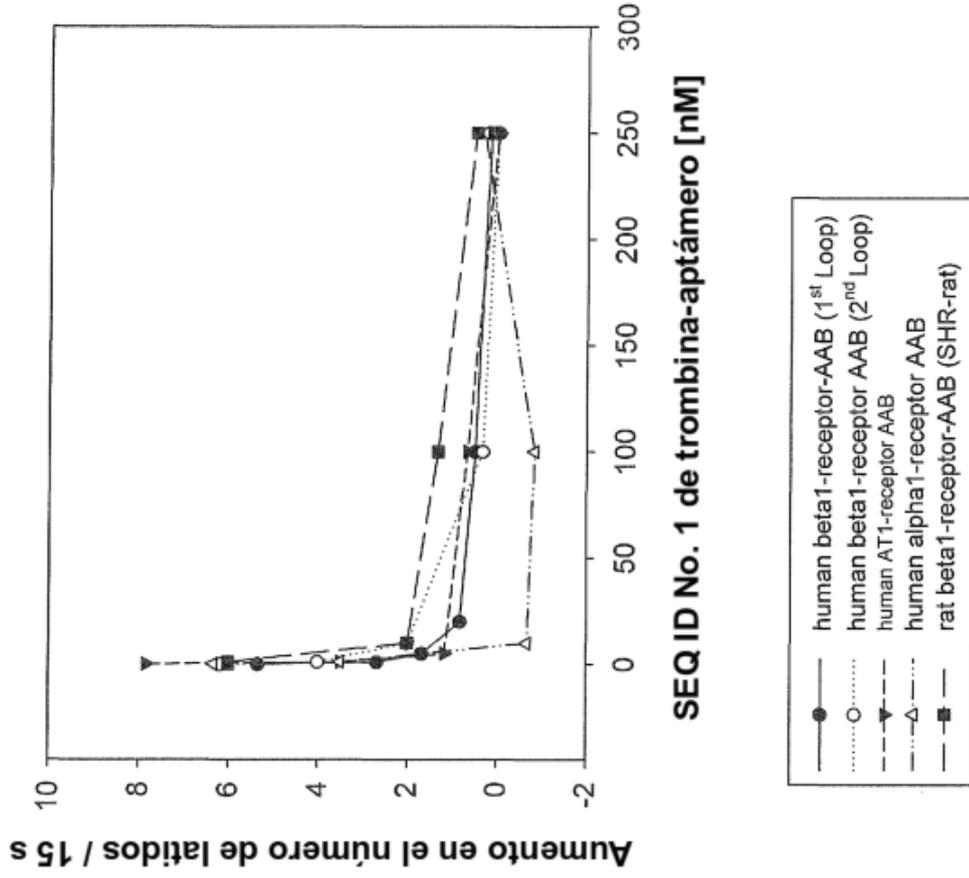


Figura 1

beta1-receptor-AAB [1:50] y IgG-3 [73 nm] que compete por la trombina-aptámero ARC 183

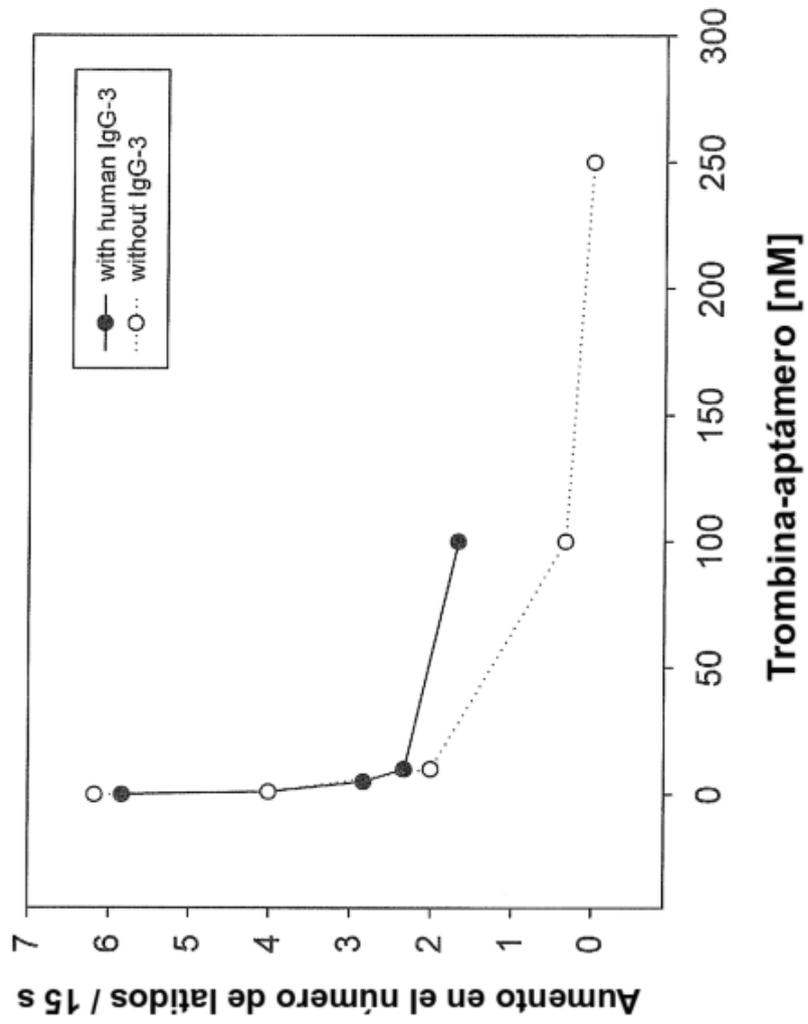


Figura 2

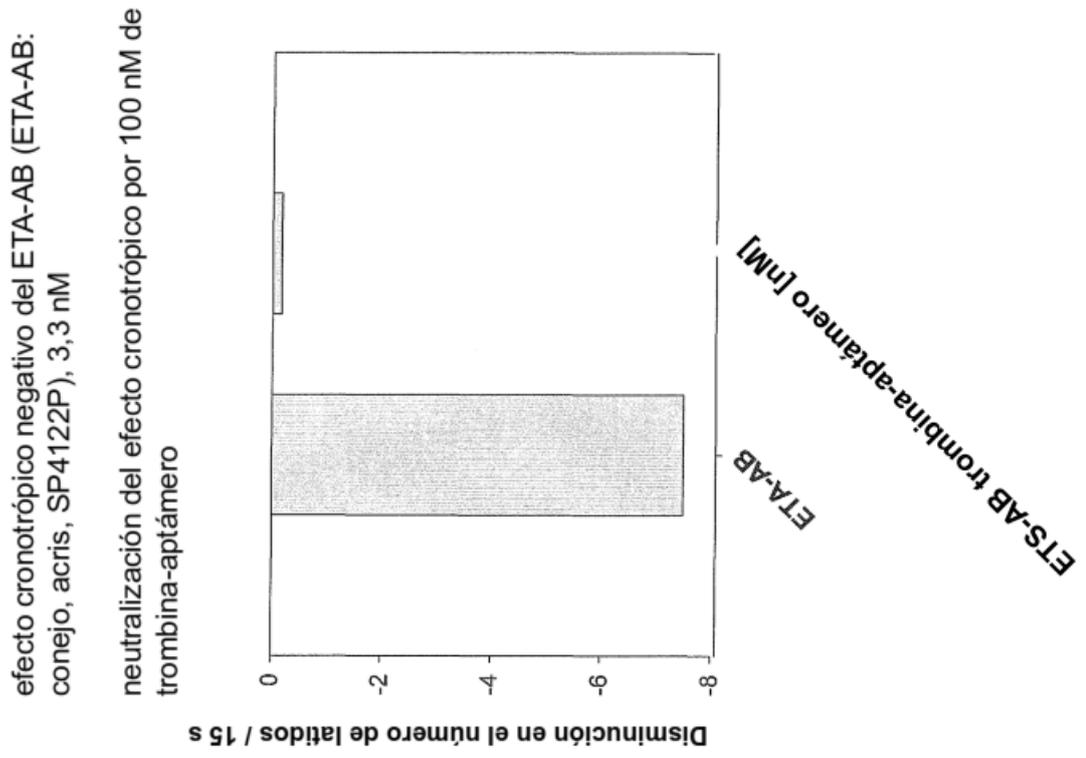


Figura 3

ETA-AB, IgG de conejo, y subclases de Ig-G [25 nm]
ETA-AB inmovilizado (conejo, acris, SP4122P)

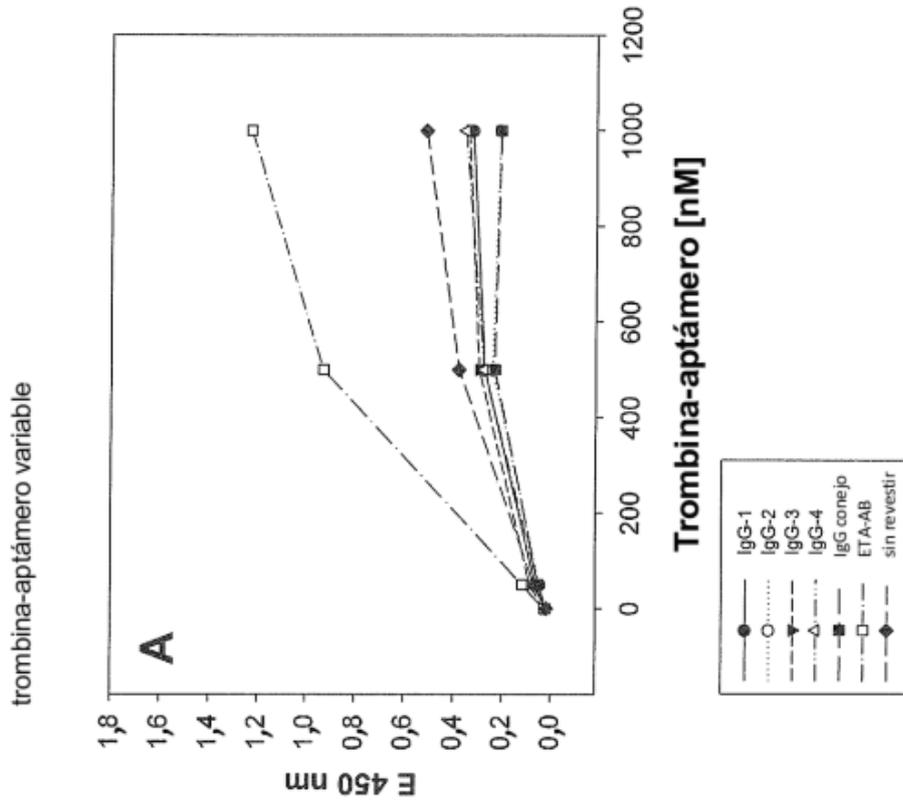


Figura 4A

ETA-AB, IgG de conejo, y subclases de Ig-G [250 nm] ETA-AB inmovilizado (conejo, acris, SP4 122P)

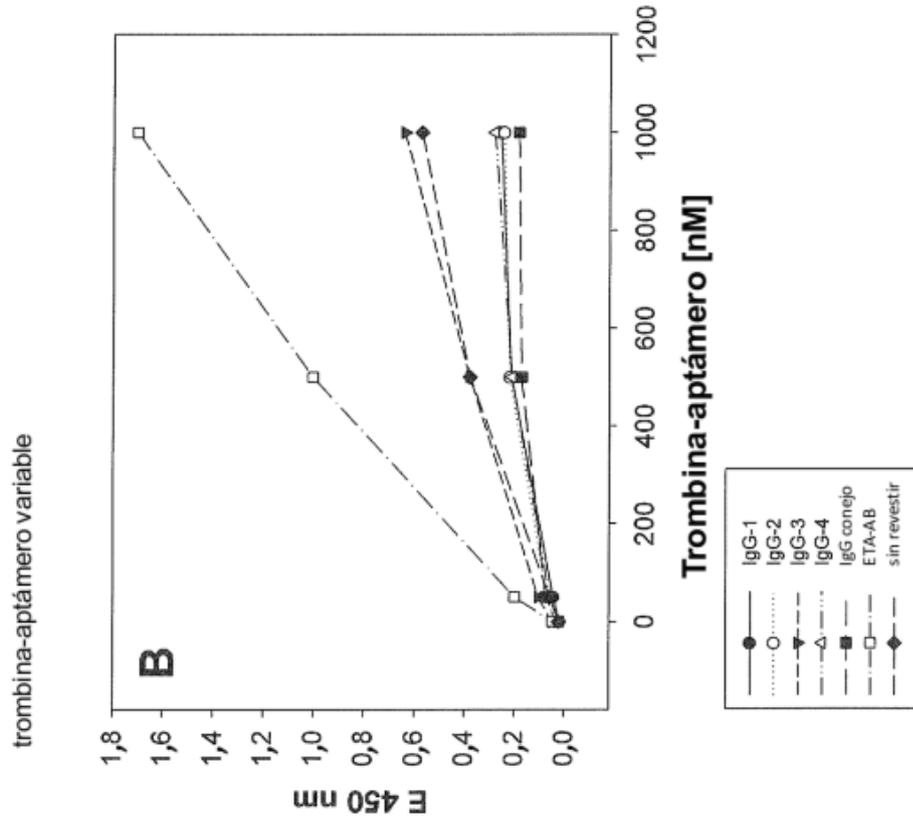


Figura 4B

ETA-AB, IgG de conejo, y subclases de Ig-G [25 nm] ETA-AB
 inmovilizado (conejo, acríl, SP4122P)

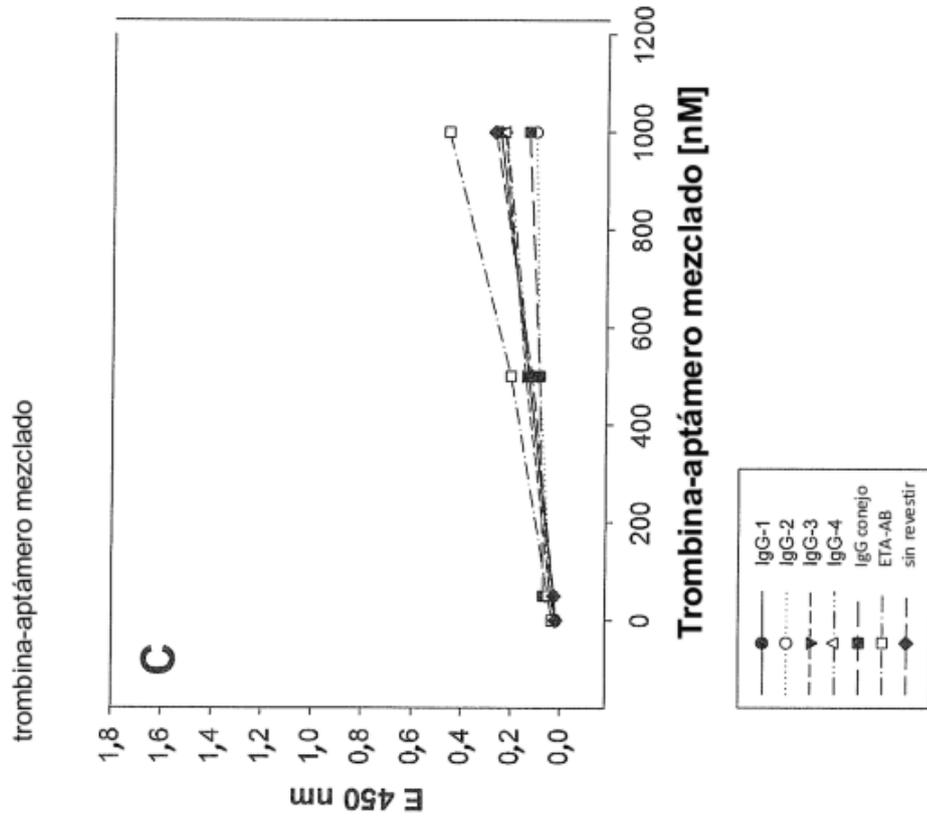


Figura 4 C

ETA-AB, IgG de conejo, y subclases de Ig-G [250 nm] ETA-AB inmovilizado (conejo, acris, SP4122P)

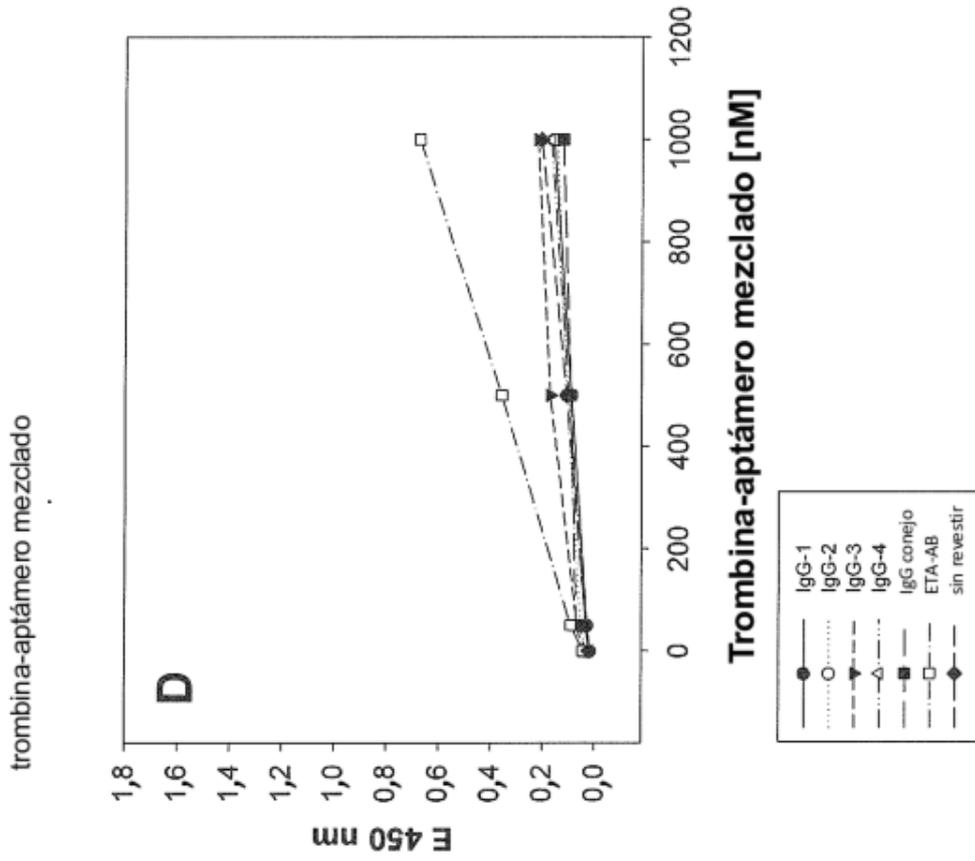


Figura 4 D

1 µg de trombina-aptámero inmovilizado sobre placas
 revestidas [0,5 µM] de Neutravidina (NA)

ETA-AB (acris, SP4122P) variable

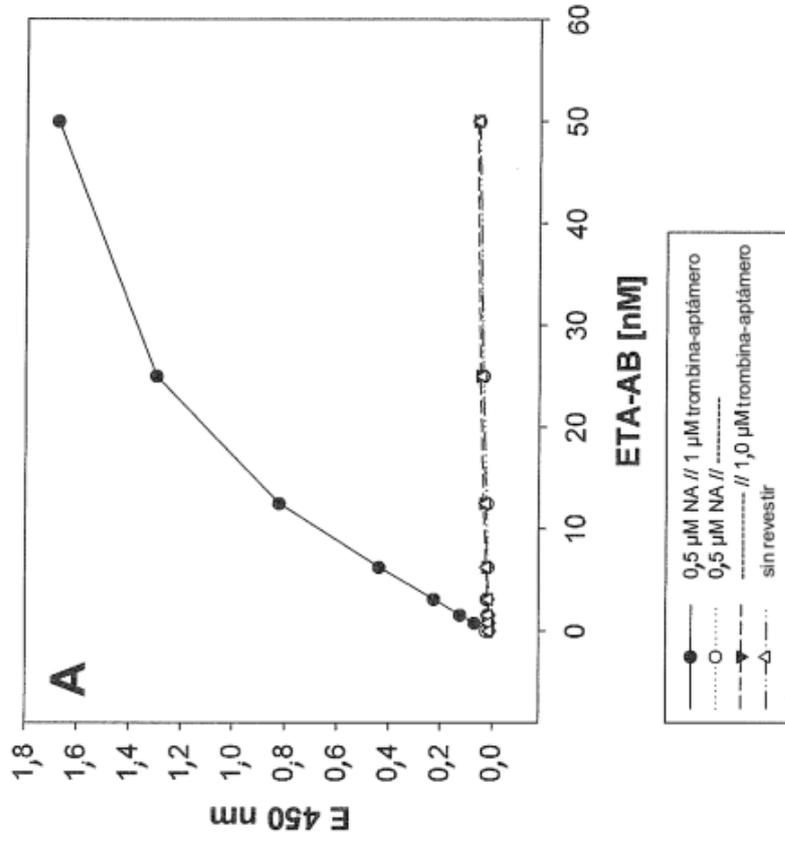


Figura 5 A

0,1 µg de trombina-aptámero inmovilizado sobre
placas revestidas [0,05 µM] de Neutravidina (NA)

ETA-AB (acris, SP4122P) variable

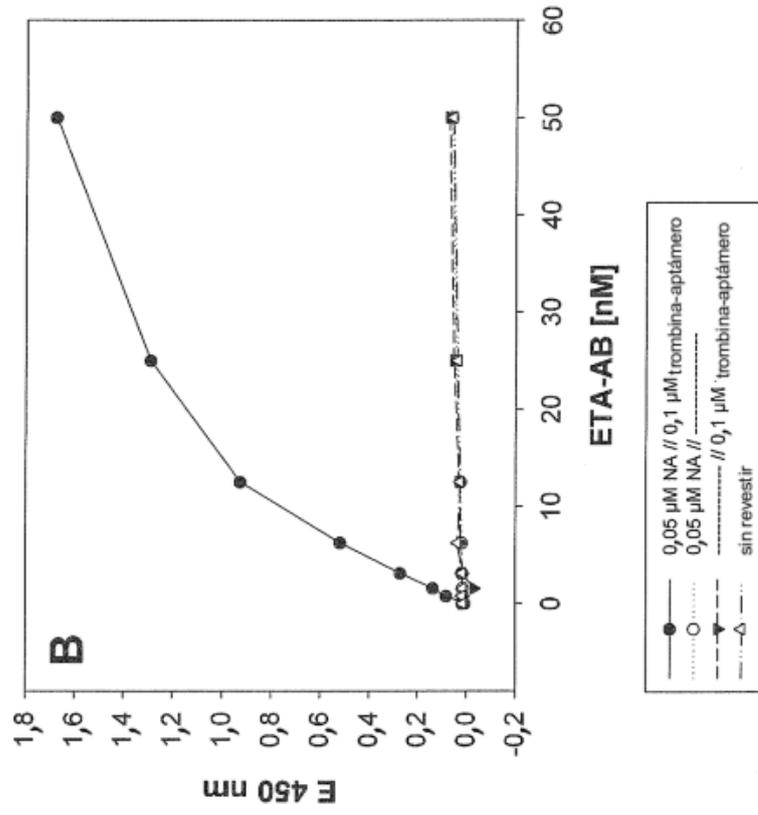


Figura 5 B

0,1 μM de trombina-aptámero (SEQ No. 1) inmovilizado sobre trombina-aptámero 0,1 μM inmovilizado (sobre placas prerrevestidas con 0,05 μM de Neutraavidina)

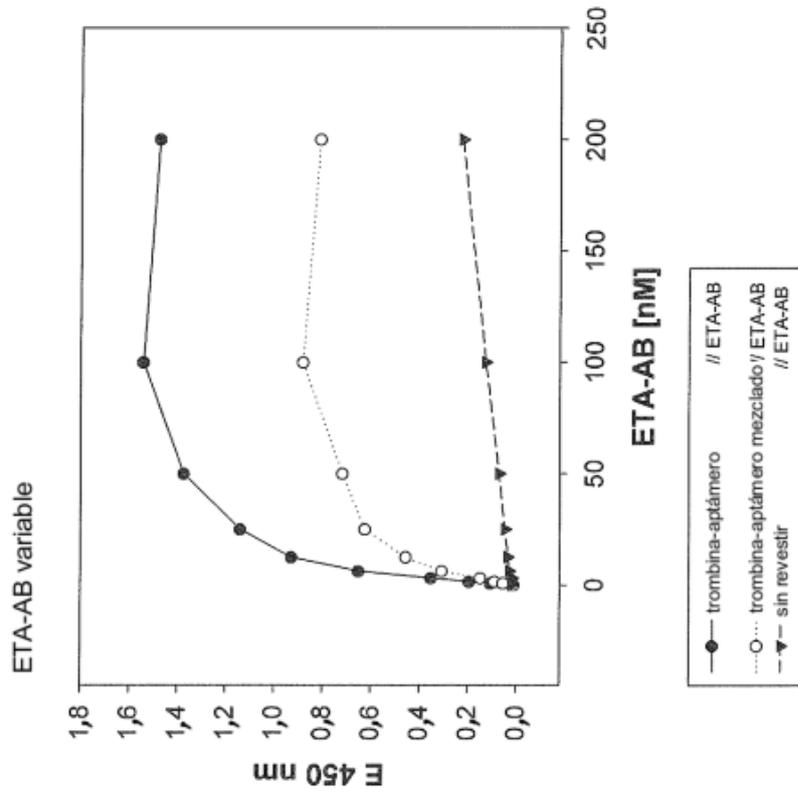


Figura 6

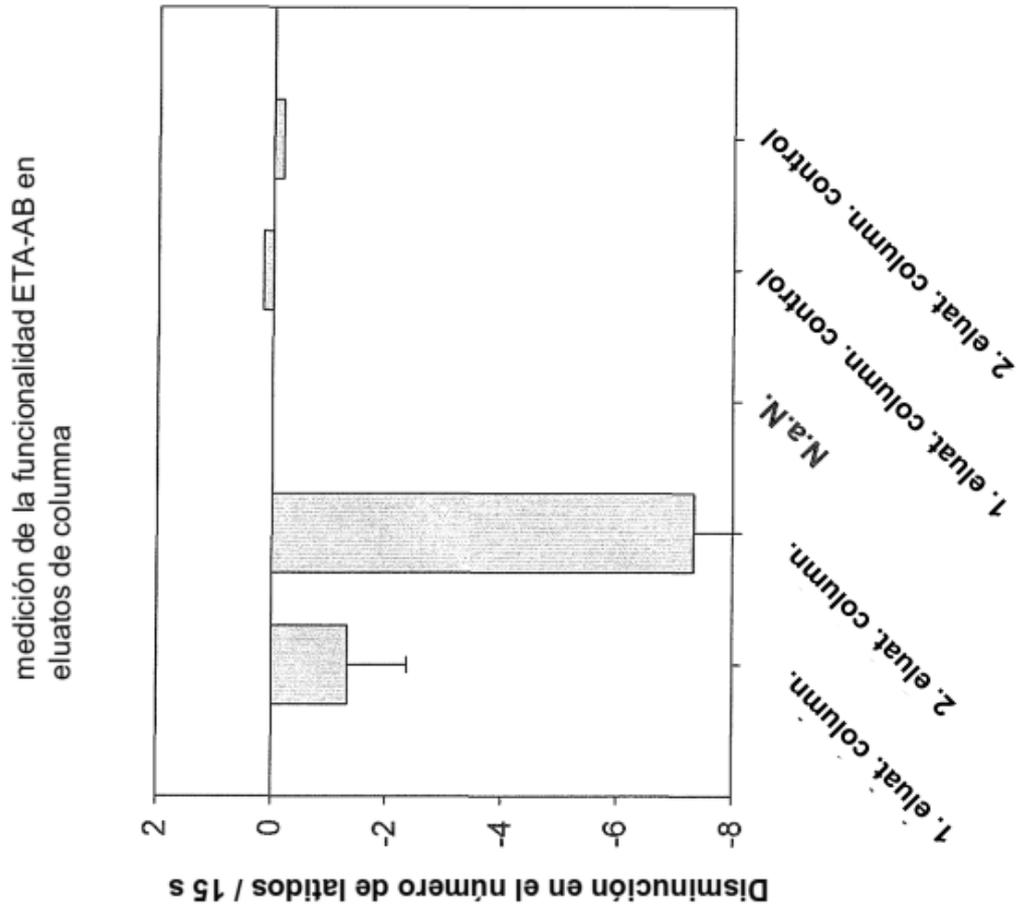


Figura 7

curva patrón de ETA-AB en KSCN 3 M dializado
frente a tampón fisiológico durante 3 d/ 4° C

placa: trombina-aptámero 0,1 µM inmovilizado sobre
una placa revestida con 0,05 µM de Neutraidina

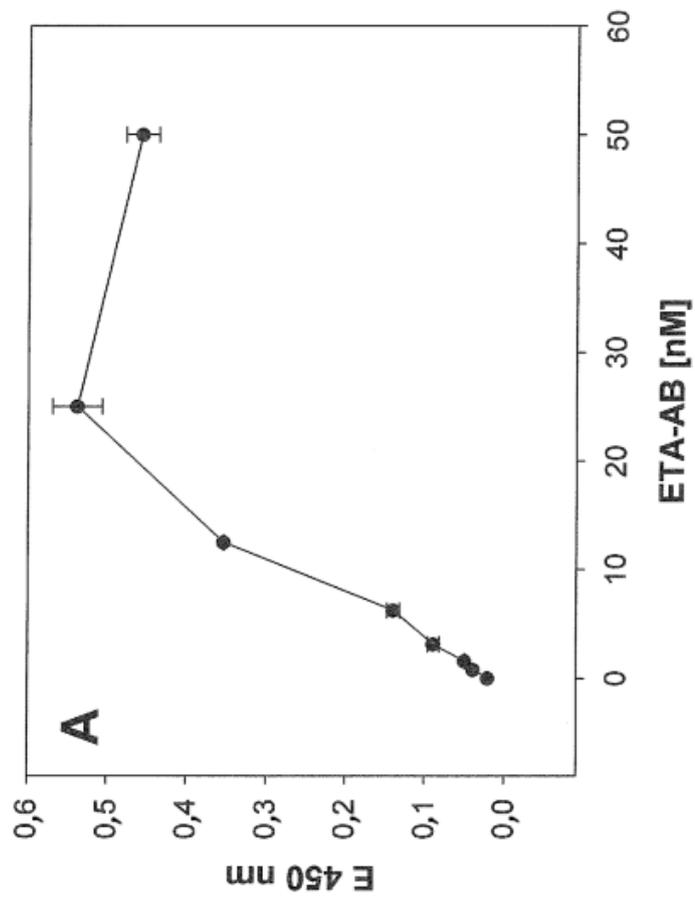


Figura 8 A

experimento en columna de trombina-aptámero (ARC183), suero enriquecido con ETA-AB
 recuperación de ETA-AB de los sistemas de flujo pistón, soluciones de lavado y eluatos
 placa: trombina-aptámero 0,1 μ M inmovilizado sobre Neutravidina 0,05 μ M

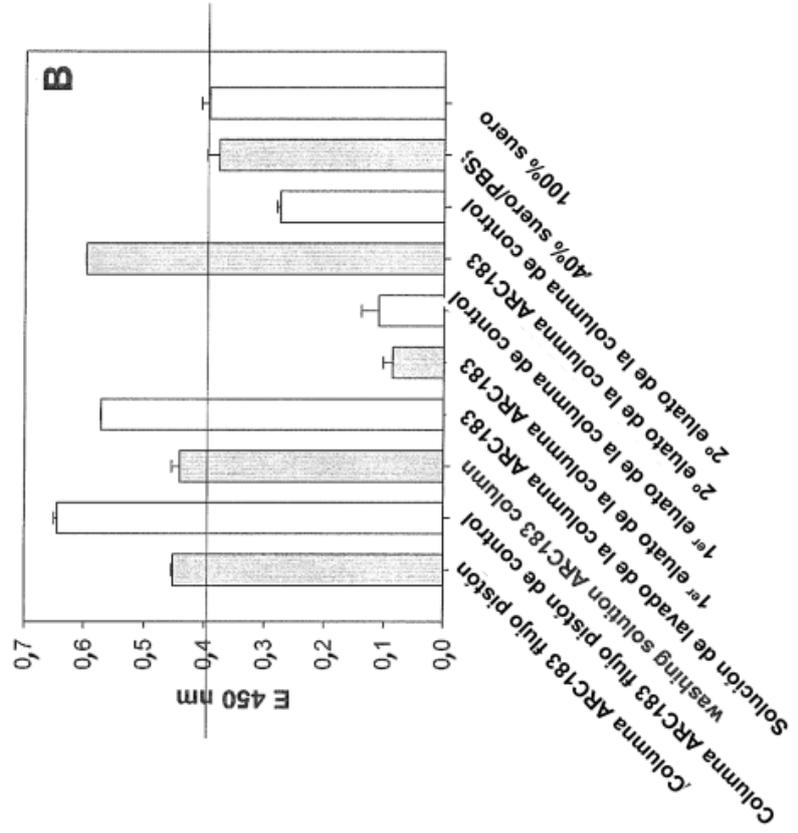


Figura 8 B

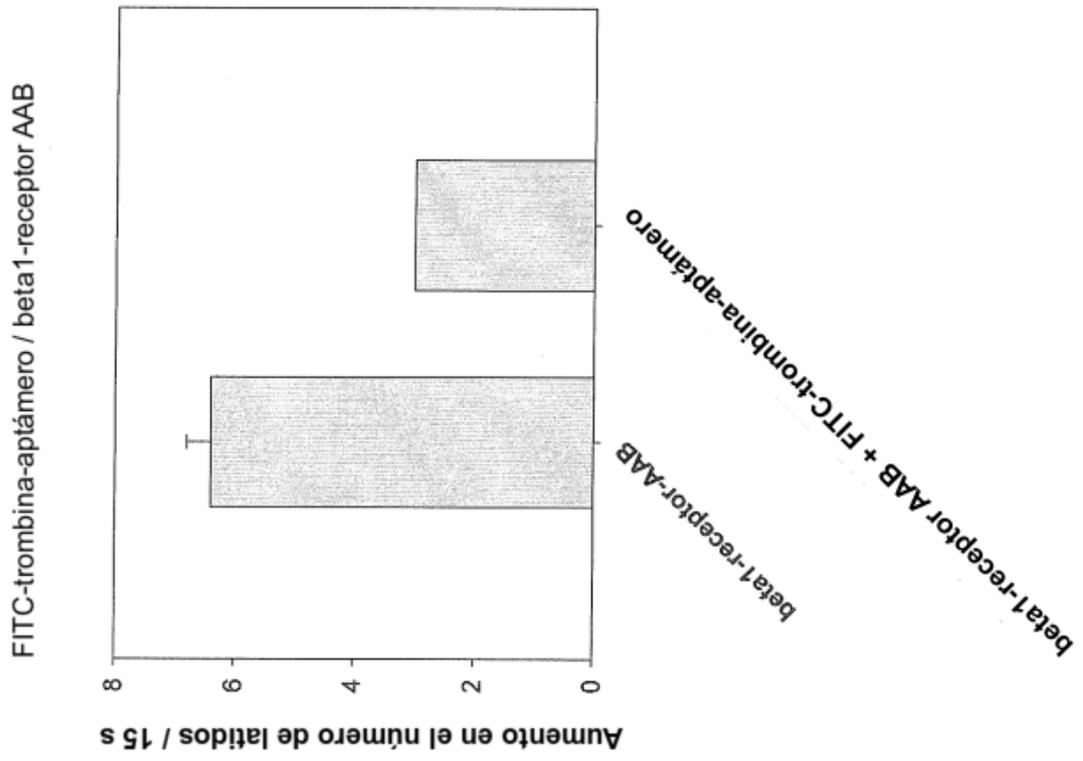


Figura 9

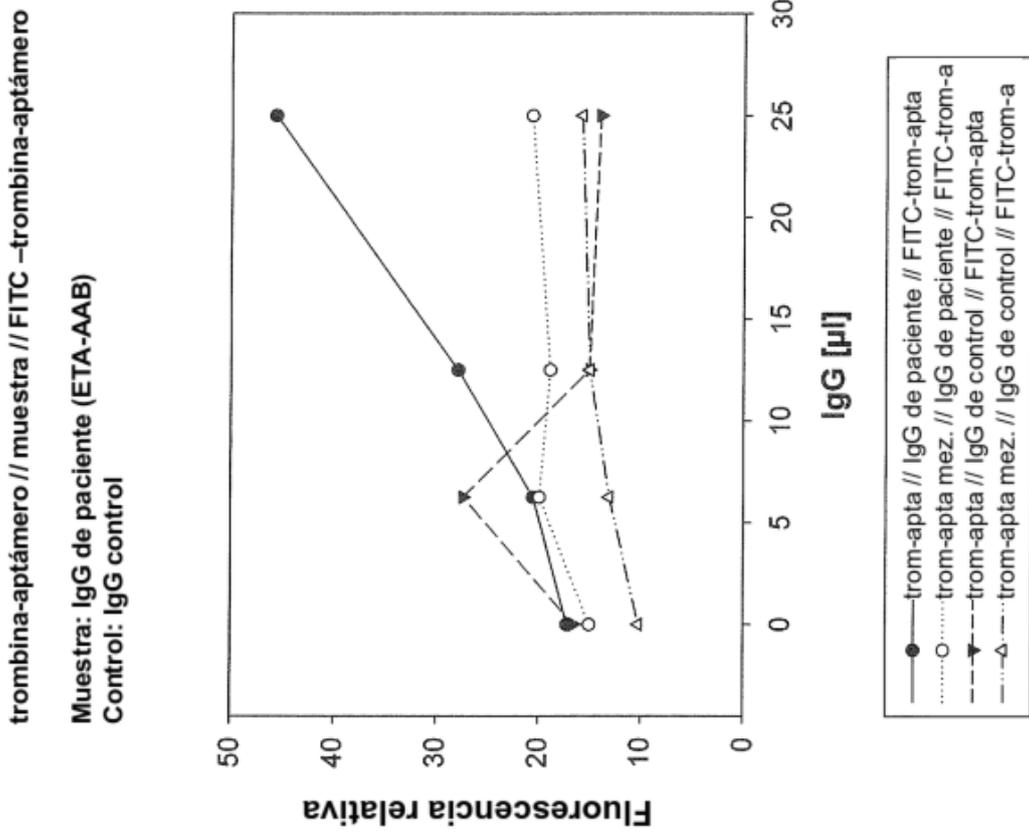


Figura 10

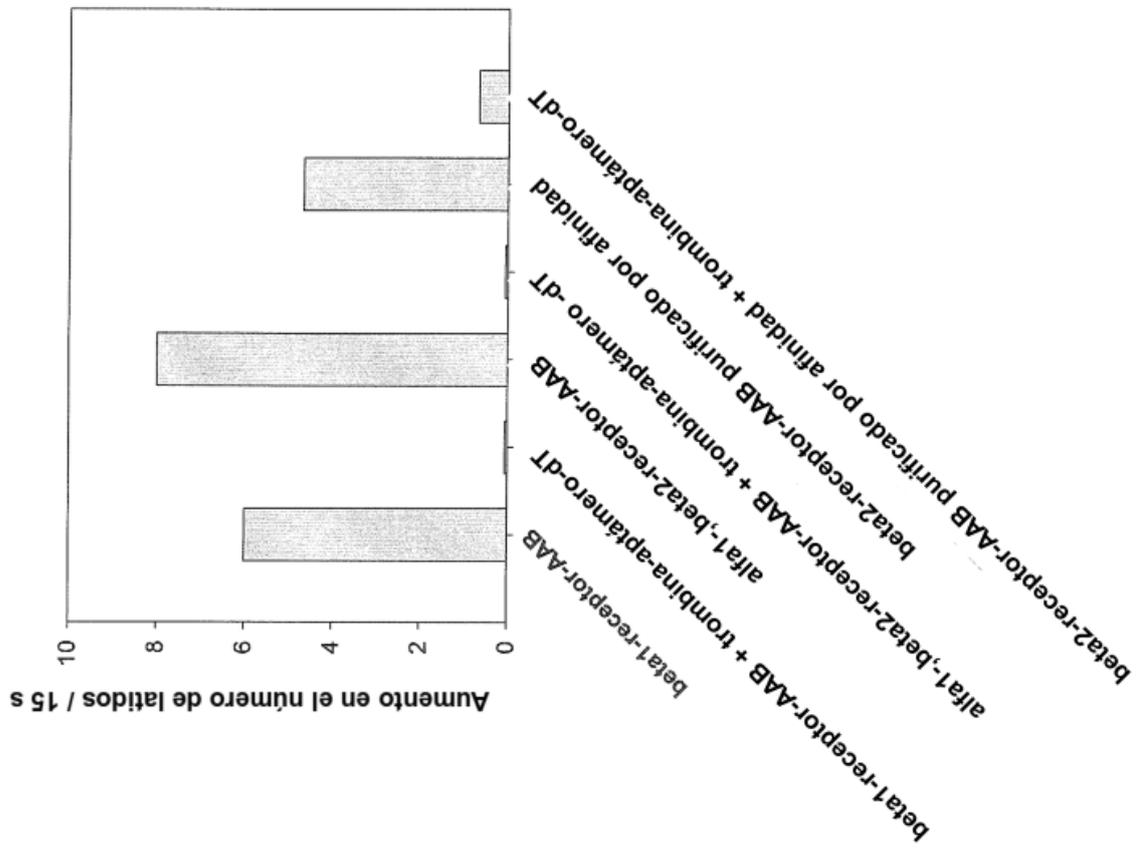


Figura 11

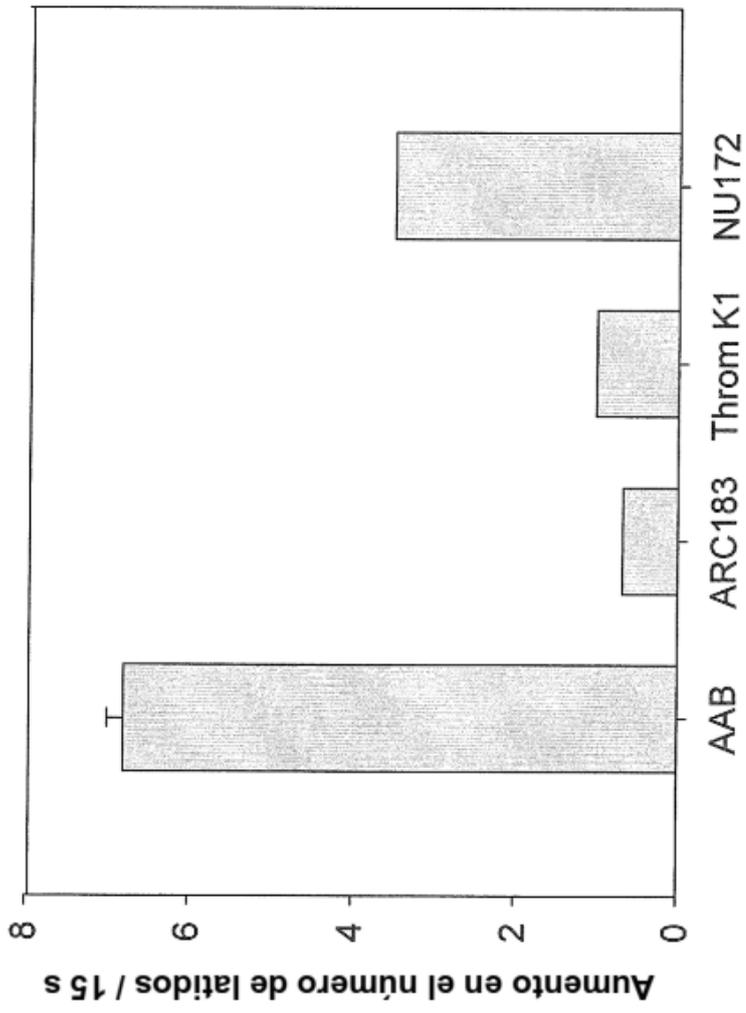


Figura 12