

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 658 492**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/115** (2010.01)

**G06F 19/00** (2011.01)

**A61K 31/713** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.08.2015 PCT/EP2015/067951**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.02.2016 WO16020377**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.08.2015 E 15744602 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.12.2017 EP 3177723**

54 Título: **Aptámeros para su uso contra enfermedades asociadas con autoanticuerpos**

30 Prioridad:

**04.08.2014 EP 14179715**

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

**12.03.2018**

73 Titular/es:

**BERLIN CURES HOLDING AG (100.0%)  
Basteiplatz 5  
8001 Zürich, CH**

72 Inventor/es:

**MÜLLER, JOHANNES**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 658 492 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

Aptámeros para su uso contra enfermedades asociadas con autoanticuerpos

### Campo técnico

- 5 La presente invención se refiere a nuevas moléculas de aptámeros para su uso en el tratamiento y/o diagnóstico de enfermedades autoinmunitarias asociadas con autoanticuerpos contra receptores acoplados a proteína G, una composición farmacéutica que comprende dichas moléculas de aptámeros, una columna de aféresis que comprende dichas moléculas de aptámeros y un procedimiento para la determinación de secuencias de nucleótidos para su uso como secuencias de moléculas de aptámeros.

### Antecedentes de la invención

- 10 El sistema inmunitario forma una parte esencial de cada mamífero. Los mamíferos hacen uso de su sistema inmunitario en la defensa contra microorganismos, en la detección y retirada de células aberrantes como por ejemplo células tumorales, y en la regeneración de tejido. Por lo tanto, el organismo se basa en dos mecanismos de defensa interconectados, inmunidad humoral y celular.

- 15 Los anticuerpos, cuando se unen con su antígeno, son desencadenantes de la respuesta inmunitaria humoral. Los anticuerpos pueden actuar de múltiples maneras. Aparte de neutralización del antígeno, los anticuerpos también activan el sistema del complemento. También hay anticuerpos que se dirigen a antígenos del propio cuerpo. Como motivo para la generación de estos denominados autoanticuerpos, se ha visto el mimetismo molecular y/o activación por proximidad. La unión específica de los autoanticuerpos con antígenos propios puede activar linfocitos citolíticos naturales (linfocitos NK) que son capaces de facilitar la degradación de estos antígenos.

- 20 Las enfermedades autoinmunitarias se basan en dicho reconocimiento y unión específicos de anticuerpos dirigidos a partes constituyentes propias del cuerpo lo que desencadena una respuesta inmunitaria contra células o tejidos propios. Aparte de este efecto inmunoestimulante, los autoanticuerpos pueden contribuir al desarrollo de fenotipos patógenos también por otros mecanismos.

- 25 Se sabe bien que hay autoanticuerpos que son específicos para la parte extracelular de receptores acoplados a proteína G tales como: receptor alfa 1 adrenérgico, receptor beta 1 adrenérgico, receptor beta 2 adrenérgico, receptor de endotelina 1 ETA, receptor muscarínico M2, receptor de angiotensina II AT1, receptores activados por proteinasa (PAR), receptores de MAS, receptores de 5HT4 y/o receptores M3 y, tras su unión específica, pueden activar o bloquear estos receptores.

- 30 Los receptores acoplados a proteína G son moléculas de transducción de señales que transducen información del espacio extracelular a la célula. Pertenecen a una familia de receptores que abarca más de 1000 receptores diferentes y se subdivide en cinco subgrupos. Representan un principio de transducción de señal sobre la membrana celular a la célula que está presente en muchas especies diferentes.

- 35 Una propiedad típica de GPCR es que tienen tres bucles extracelulares diferentes con diferentes epítomos con los que pueden unirse sustancias y provocar diferentes interacciones intracelulares. La proteína humoral adrenalina es capaz de unirse con el receptor beta 1 adrenérgico para aumentar la fuerza y frecuencia del latido de una célula muscular cardíaca.

- 40 Los autoanticuerpos funcionalmente patógenos contra GPCR son frecuentemente, pero no siempre, del subtipo IgG3 (glucoproteína Inmunoglobulina G, subclase 3) y tienen la capacidad de unirse con diferentes bucles de GPCR y con diferentes sitios dentro de los bucles. Estos anticuerpos funcionalmente patógenos ejercen una función patológica celular y a su vez orgánica por su interacción con el GPCR.

- 45 Por lo tanto, hay muchos autoanticuerpos diferentes que se dirigen contra receptores diferentes. En el caso del músculo cardíaco, estos son por ejemplo los autoanticuerpos dirigidos contra el receptor beta 1 adrenérgico o el receptor muscarínico de acetilcolina. Otros anticuerpos que tienen un papel importante en otras enfermedades se dirigen contra el receptor alfa 1 adrenérgico, receptor alfa 2 adrenérgico, receptor beta 2 adrenérgico, receptor de endotelina 1 ETA, receptor muscarínico M2, receptor de angiotensina II AT1, receptores activados por proteinasa (PAR), receptores de MAS, receptores de 5HT4, receptores M3 y otros.

La presencia de dichos autoanticuerpos en un organismo puede conducir a efectos agonistas o antagonistas en el sentido de una activación o un bloqueo permanente de los receptores respectivos que desempeñan un papel en el desarrollo de la enfermedad.

- 50 La miocardiopatía dilatada (MCD) es una de las enfermedades en las que un alto porcentaje de los pacientes tienen dichos autoanticuerpos activadores que se unen con partes extracelulares del receptor beta 1 adrenérgico, en particular con el 1<sup>er</sup> o el 2<sup>o</sup> bucle del receptor beta 1 adrenérgico. En consecuencia, se ha sugerido una patogénesis autoinmunitaria de MCD en estos pacientes. Tras la unión de estos autoanticuerpos los receptores se activan continuamente porque el mecanismo de retroalimentación fisiológica que limita la activación de los GPCR se

suprime.

5 Hay otras enfermedades del sistema cardiovascular que se ha sugerido que están relacionadas con la presencia de autoanticuerpos contra receptores acoplados a proteína G tales como miocardiopatía de Chagas, miocardiopatía del periparto, miocarditis, hipertensión pulmonar e hipertensión maligna. También se han encontrado autoanticuerpos contra receptores acoplados a proteína G en pacientes por ejemplo con glaucoma, diabetes mellitus, hiperplasia prostática benigna, esclerodermia, síndrome de Raynaud y preeclampsia y en enfermedad de Chagas crónica así como los que tienen rechazo a aloinjerto de riñón.

10 Habitualmente, las regiones epitópicas de estos receptores consisten en cadenas peptídicas que comprenden aproximadamente 20 aminoácidos, mientras que los epítomos específicos de enfermedad constituyen una secuencia de 3 a 5 aminoácidos de una de estas regiones. Sin embargo, la interacción no deseada de autoanticuerpos con estos epítomos desempeña un papel importante para el desarrollo y la cronificación de varias enfermedades autoinmunitarias.

15 En estudios recientes, se ha podido mostrar que la retirada de estos autoanticuerpos de la sangre mediante adsorción de 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 immunoadsorption. 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. Dorffel, S. B. Felix, G. Wallukat, S. Brehme, K. Bestvater, T. Hofmann, F. K. Kleber, G. Baumann, P. Reinke (1997) Short-term hemodynamic effects of immunoadsorption in dilated cardiomyopathy. Circulation 95, 1994-1997 y W. V. Dorffel, G. Wallukat, Y. Dorffel, S. B. Felix, G. Baumann (2004) Immunoadsorption in idiopathic dilated cardiomyopathy, a 3-year follow-up. Int J. Cardiol. 97,20 529-534).

25 Se ha descubierto además que ciertos aptámeros pueden usarse para interferir con la interacción de anticuerpos, en particular de autoanticuerpos, específicos para el 2º bucle extracelular del receptor beta 1-adrenérgico humano con su diana (documento WO 2012/000889 A1). Los aptámeros son oligonucleótidos de cadena corta caracterizados por una alta afinidad por su molécula diana. Inhibiendo la interacción, los aptámeros fueron capaces de disminuir o incluso anular la activación permanente del receptor beta 1 adrenérgico sin la necesidad de retirar estos anticuerpos. Se han desvelado aptámeros adicionales para el uso en el tratamiento y/o diagnóstico de enfermedades autoinmunitarias que se asocian con la presencia de autoanticuerpos contra receptores acoplados a proteína G en el documento WO 2012/119938 A2.

30 De acuerdo con una realización preferida, los aptámeros se usan para reducir o anular la activación del receptor acoplado a proteína G por el autoanticuerpo respectivo. De acuerdo con otra realización preferida, los aptámeros se usan para neutralizar los autoanticuerpos dirigidos contra un receptor acoplado a proteína G y/o para reducir el efecto de los autoanticuerpos en los receptores acoplados a proteína G contra los que se dirigen.

35 Sin embargo, solamente está disponible en la actualidad un número muy limitado de aptámeros que podrían aplicarse contra las enfermedades autoinmunitarias anteriormente indicadas específicas y su eficacia e inocuidad para aplicación en pacientes humanos aún no se ha confirmado. Se desea por lo tanto la disponibilidad de aptámeros adicionales que muestren interferencia potenciada con la interacción de autoanticuerpos con GPCR.

40 En consecuencia, es un objeto de la presente invención proporcionar nuevos aptámeros para el uso en el tratamiento y/o diagnóstico de enfermedades autoinmunitarias asociadas con autoanticuerpos contra receptores acoplados a proteína G.

Además, es otro objeto de la presente invención proporcionar una composición farmacéutica que comprenda dichas moléculas de aptámeros así como columnas de aféresis que comprendan dichos aptámeros.

45 También es un objeto de la presente invención proporcionar un procedimiento para la determinación de secuencias de nucleótidos de nuevos aptámeros para el uso en la terapia y/o el diagnóstico de enfermedades autoinmunitarias asociadas con autoanticuerpos contra receptores acoplados a proteína G.

**Sumario de la invención**

Este objeto se resuelve por los aspectos de la presente invención como se especifican en lo sucesivo en el presente documento.

50 De acuerdo con el primer aspecto de la presente invención, se proporciona un aptámero que comprende una secuencia de nucleótidos que satisface una gramática definida por el conjunto de normas de producción P:

$$\begin{aligned}
 P = \{ & \\
 S & \rightarrow M | Y | D | E | H \quad (1) \\
 M & \rightarrow NRM \quad (2) \\
 M & \rightarrow MR \quad (3)
 \end{aligned}$$

	(continuación)	
M	→ RM	(4)
N	→ M	(5)
D	→ YM	(6)
E	→ VM	(6a)
Y	→ K   KL   LK   LKL	(7)
H	→ LV   V	(8)
R	→ L	(9)
Z	→ A   C   G   T	(10)
L	→ ZL   Z	(11)
BX	→ G <sup>x</sup>	(12)
CX	→ BXLBX	(13)
M	→ CXLCX	(14)
K	→ CXLBX	(15)
V	→ CXL	(16)
	}	

con las condiciones de

- 5 a.) Q es el conjunto de números naturales  
 b.) F es un subconjunto de números naturales definido como

$$F = \{X \in \mathbb{Q} \mid (X > 1)\}$$

c.) Usando F se definen:

- 10 (1)  $\forall X \in F \exists M : M \rightarrow M \text{ CXLXCX}$   
 (2)  $\forall X \in F \exists K : K \rightarrow CXLBX$   
 (3)  $\forall X \in F \exists V : V \rightarrow CXL$   
 (4)  $\forall X \in F : CX \rightarrow BXLBX$

(5)  $\forall X \in F : BX \rightarrow \prod_1^X G$

d.) U es un conjunto de no terminales definido como

$$U = \{S, M, N, D, E, Y, H, R, Z, L, BX, CX, K, V\}$$

- 15 Para BX y CX véase c)  
 e.) W es un conjunto de terminales definido como

$$W = \{A, C, G, T, G^x\}$$

G<sup>x</sup> indica todos los terminales que pueden obtenerse de acuerdo con b.) y c.) (5)

f.) S ∈ U es el símbolo de partida

- 20 para uso en el tratamiento y/o diagnóstico de enfermedades autoinmunitarias asociadas con autoanticuerpos contra receptores acoplados a proteína G, en la que “A” significa un nucleótido de adenina, “C” significa un nucleótido de citosina, “G” significa un nucleótido de guanina y “T” significa un nucleótido de timina si la secuencia de nucleótidos es una secuencia de ADN, y “T” significa un nucleótido de uracilo si la secuencia de nucleótidos es una secuencia de ARN, en el que el aptámero no comprende la secuencia de nucleótidos GGTTGGTGTGGTTGG (SEC ID NO: 22), GGTTGGTGTGGT (SEC ID NO: 23) o CGCCTAGGTTGGGTAG-GGTGGTGGCG (SEC ID NO: 24).

En una realización preferida del primer aspecto de la invención, la secuencia de nucleótidos del aptámero tiene una longitud de como máximo 593 nucleótidos.

En otra realización preferida del primer aspecto de la invención, la secuencia de nucleótidos es una secuencia de ADN.

- 30 En otra realización preferida más del primer aspecto de la invención, la secuencia de nucleótidos es una secuencia de ARN.

En una realización preferida del primer aspecto de la invención, la secuencia de nucleótidos comprendida en el aptámero es una cualquiera de las siguientes secuencias.

- 5 (5'-GTTGTTTGGGGTGG-3' SEQ ID NO: 1),  
 (5'-GTTGTTTGGGGTGGT-3' SEQ ID NO: 2),  
 (5'-GGTTGGGGTGGGTGGGGTGGGTGGG-3' SEQ ID NO: 3),  
 (5'-TTTGGTGGTGGTGGTTGTGGTGGTGGTGG-3' SEQ ID NO: 4),  
 (5'-TTTGGTGGTGGTGGTTGTGGTGGTGGTGG-3' SEQ ID NO: 5),  
 (5'-TTTGGTGGTGGTGGTTTTGGTGGTGGTGG-3' SEQ ID NO: 6),  
 (5'-TTTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGG-3' SEQ ID NO: 7),  
 10 (5'-TTTGGTGGTGGTGGTTTTGGTGGTGGTGG-3' SEQ ID NO: 8),  
 (5'-TGGTGGTGGTGGT-3' SEQ ID NO: 9),  
 (5'-GGTGGTGGTGG-3' SEQ ID NO: 10),  
 (5'-GGTGGTTGTGGTGG-3' SEQ ID NO: 11),  
 (5'-GGTGGTGGTGGTTGTGGTGGTGGTGG-3' SEQ ID NO: 12),  
 15 **(5-GGTGGTGGTGGTTGTGGTGGTGGTGGTTGTGGTGGTGGTGGTGG TGG-3' SEQ ID NO: 13),**  
 (5'-GGTGGTTGTGGTGGTTGTGGTGGTTGTGGTGG-3' SEQ ID NO: 14),  
 20 (5'-TTTGGTGGTGGTGGTTGTGGTGGTGGTGGTTT-3' SEQ ID NO: 15),  
 (5'-GGTGGTGGTGGTTGTGGTGGTGGTGGTTT-3' SEQ ID NO: 16),  
 (5'-TTTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGG-3' SEQ ID NO: 17),  
 (5'-TGGTGGTGGT-3' SEQ ID NO: 18),  
 (5'-TTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG-3' SEQ ID NO: 20).

25 En una realización preferida del primer aspecto de la invención, la secuencia de nucleótidos del aptámero tiene una longitud de al menos 4 nucleótidos, preferentemente al menos 8 nucleótidos, más preferentemente al menos 12 nucleótidos.

30 En una realización preferida del primer aspecto de la invención, la secuencia de nucleótidos del aptámero tiene una longitud de como máximo 120 nucleótidos, preferentemente como máximo 100 nucleótidos, más preferentemente como máximo 80 nucleótidos.

35 En una realización preferida del primer aspecto de la invención, el aptámero es capaz de interaccionar con un autoanticuerpo, preferentemente un autoanticuerpo que es específico para un receptor acoplado a proteína G, preferentemente específico para uno cualquiera del receptor acoplado a proteína G humano receptor alfa 1 adrenérgico, receptor beta 1 adrenérgico, receptor beta 2 adrenérgico, receptor de endotelina 1 ETA, receptor muscarínico M, receptor de angiotensina II AT1, receptores PAR, receptor de MAS, receptor de 5HT4 y/o receptor M3.

En una realización preferida del primer aspecto de la invención, el aptámero es para su uso como ingrediente selectivo durante aféresis terapéutica de sangre o constituyentes de la misma de un paciente que padece una enfermedad autoinmunitaria asociada con la aparición de autoanticuerpos contra receptores acoplados a proteína G.

40 En una realización preferida del primer aspecto de la invención, la enfermedad autoinmunitaria es una de miocardiopatía, miocardiopatía isquémica (MCi), miocardiopatía dilatada (MCD), miocardiopatía del parto (MCPP), miocardiopatía idiopática, miocardiopatía de Chagas, miocardiopatía inducida por quimioterapia, megacolon de Chagas, megaesófago de Chagas, neuropatía de Chagas, hiperplasia prostática benigna, esclerodermia, síndrome de Raynaud, enfermedad oclusiva arterial periférica (EOAP), preeclampsia, rechazo de aloinjerto de riñón,  
 45 miocarditis, glaucoma, hipertensión pulmonar, hipertensión maligna, síndrome metabólico, alopecia, alopecia areata, migraña, enfermedad de Parkinson, epilepsia, cefalea en racimo, esclerosis múltiple, depresión, síndrome de dolor regional, angina de pecho inestable, lupus eritematoso sistémico (LES), esquizofrenia, síndrome de Sjögren, periodontitis, fibrilación auricular, vitiligo, síndrome urémico hemolítico, síndrome de la persona rígida y/o bloqueo cardíaco congénito.

50 En una realización preferida del primer aspecto de la invención, el aptámero es para uso en detección *in vitro* de un anticuerpo que es específico para un receptor acoplado a proteína G, preferentemente el receptor acoplado a proteína G humano receptor alfa 1 adrenérgico, receptor beta 1 adrenérgico, receptor beta 2 adrenérgico, receptor de endotelina 1 ETA, receptor muscarínico M, receptor de angiotensina II AT1, receptores PAR, receptor de MAS, receptor de 5HT4 y/o receptor M3.

55 En otra realización preferida del primer aspecto de la invención, el anticuerpo para detectar es un autoanticuerpo.

En otra realización preferida más del primer aspecto de la invención, el anticuerpo está presente en o se obtiene de un líquido corporal, preferentemente un líquido de un cuerpo humano, más preferentemente de sangre, plasma, suero, orina, heces, líquido sinovial, líquido intersticial, linfa, saliva, líquido cefalorraquídeo y/o líquido lagrimal

humano.

5 En otra realización preferida más del primer aspecto de la invención, el líquido corporal se toma de un individuo que padece o se sospecha que padece una enfermedad autoinmunitaria, preferentemente una enfermedad autoinmunitaria asociada con presencia en el suero del paciente de autoanticuerpos específicos para un receptor acoplado a proteína G, más preferentemente enfermedades autoinmunitarias asociadas con la presencia en el suero del paciente de autoanticuerpos específicos para receptor alfa 1 adrenérgico, receptor beta 1 adrenérgico, receptor beta 2 adrenérgico, receptor de endotelina 1 ETA, receptor muscarínico M, receptor de angiotensina II AT1, receptores PAR, receptor de MAS, receptor de 5HT4 y/o receptor M3.

10 En otra realización preferida más del primer aspecto de la invención, el aptámero comprende la siguiente secuencia de nucleótidos (5'-GGTGGTGGTGGTTGTGGTGGTGGTGG-3' SEQ ID NO: 12).

De acuerdo con el segundo aspecto de la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende al menos un aptámero de la presente invención y, opcionalmente, al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

15 En una realización preferida del segundo aspecto de la presente invención, la composición farmacéutica se proporciona para el uso en el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias asociadas con autoanticuerpos contra receptores acoplados a proteína G.

De acuerdo con el tercer aspecto de la presente invención, se proporciona una columna de aféresis que comprende un aptámero de acuerdo con el primer aspecto de la invención.

20 En una realización preferida del tercer aspecto de la invención, la columna de aféresis se proporciona para su uso en el tratamiento y/o el diagnóstico de una enfermedad autoinmunitaria, en el que la enfermedad autoinmunitaria es miocardiopatía, miocardiopatía dilatada (MCD), miocardiopatía isquémica (MCi), miocardiopatía del parto (MCP), miocardiopatía idiopática, miocardiopatía de Chagas, miocardiopatía inducida por quimioterapia, megacolon de Chagas, megaesófago de Chagas, neuropatía de Chagas, hiperplasia prostática benigna, esclerodermia, síndrome de Raynaud, enfermedad oclusiva arterial periférica (EOAP), preeclampsia, rechazo de aloinjerto de riñón, 25 miocarditis, glaucoma, hipertensión pulmonar, hipertensión maligna, síndrome metabólico, alopecia, alopecia areata, migraña, enfermedad de Parkinson, epilepsia, cefalea en racimo, esclerosis múltiple, depresión, síndrome de dolor regional, angina de pecho inestable, lupus eritematoso sistémico (LES), esquizofrenia, síndrome de Sjögren, periodontitis, fibrilación auricular, vitiligo, síndrome urémico hemolítico, síndrome de la persona rígida y/o bloqueo cardíaco congénito.

30 De acuerdo con el cuarto aspecto de la presente invención, se proporciona un procedimiento para la preparación de un oligonucleótido de aptámero que comprende las etapas de determinación de una secuencia de nucleótidos para su uso como una secuencia de aptámero que comprende la aplicación del siguiente conjunto de normas de producción P:

P={		
S	→	M   Y   D   E   H (1)
M	→	NRM (2)
M	→	MR (3)
M	→	RM (4)
N	→	M (5)
D	→	YM (6)
E	→	VM (6a)
Y	→	K   KL   LK   LKL (7)
H	→	LV   V (8)
R	→	L (9)
Z	→	A   C   G   T (10)
L	→	ZL   Z (11)
BX	→	G <sup>x</sup> (12)
CX	→	BXLBX (13)
M	→	CXLCX (14)
K	→	CXLBX (15)
V	→	CXL (16)
}		

con las condiciones de

- a.) Q es el conjunto de números naturales
- b.) F es un subconjunto de números naturales definido como

$$F = \{X \in \mathbb{Q} \mid (X > 1)\}$$

5 c.) Usando F se definen:

- (1)  $\forall X \in F \exists M : M \rightarrow M \text{ CXLCX}$
- (2)  $\forall X \in F \exists K : K \rightarrow \text{CXLBX}$
- (3)  $\forall X \in F \exists V : V \rightarrow \text{CXL}$
- (4)  $\forall X \in F : \text{CX} \rightarrow \text{BXLBX}$

10 (5)  $\forall X \in F : \text{BX} \rightarrow \prod_1^X G$

d.) U es un conjunto de no terminales definido como

$$U = \{S, M, N, D, E, Y, H, R, Z, L, \text{BX}, \text{CX}, K, V\}$$

Para BX y CX véase c)

e.) W es un conjunto de no terminales definidos como

15  $W = \{A, C, G, T, G^X\}$

G<sup>X</sup> indica todos los terminales que pueden obtenerse de acuerdo con b.) y c.) (5)

f.) S ∈ U es el símbolo de partida

20 en la que “A” significa un nucleótido de adenina, “C” significa un nucleótido de citosina, “G” significa un nucleótido de guanina y “T” significa un nucleótido de timina si la secuencia de nucleótidos es una secuencia de ADN y “T” significa un nucleótido de uracilo si la secuencia de nucleótidos es una secuencia de ARN y producir un oligonucleótido de aptámero que tiene la secuencia de nucleótidos obtenida en la primera etapa.

**Descripción de las figuras**

- La Figura 1 muestra la neutralización de los AAB de adrenorreceptor alfa 1 por aptámeros (2 μl).
- La Figura 2 muestra la neutralización de los AAB de adrenorreceptor beta 1 por aptámeros (2 μl).
- 25 La Figura 3 muestra la influencia de los aptámeros en los efectos del AAB contra los receptores PAR1/PAR2.
- La Figura 4 muestra la neutralización de los AAB de receptor de endotelina 1 ETA por aptámeros (2 μl).
- La Figura 5 muestra la neutralización del efecto del AAB de adrenorreceptor β1 por los aptámeros de SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 19 y SEQ ID NO: 20.
- La Figura 6 muestra los efectos de diferentes aptámeros (2 μl) en la frecuencia cardíaca de los cardiomiocitos.
- 30 La Figura 7 muestra los efectos del aptámero de SEQ ID NO: 12 en AAB dirigidos contra diferentes receptores acoplados a proteína G.
- La Figura 8 muestra la neutralización de los AAB de adrenorreceptor beta 1 por 100 nM, 400 nM y 1000 nM de diferentes aptámeros (SEQ ID NO: 1, 4 a 9, 11 a 14 y 16 a 18) de acuerdo con la invención (2 μl).
- La Figura 9 muestra identidades de secuencias mutuas de aptámeros calculadas usando la gramática dada de acuerdo con la invención entre sí (SEQ ID NO: 25 a 45) y con secuencias de control (SEQ ID NO: 46 a 50) que no están de acuerdo con la invención.
- 35 La Figura 10 muestra la neutralización de los AAB de adrenorreceptor beta 1 por 100 nM de diferentes aptámeros (SEQ ID NO: 25 a 45) de acuerdo con la invención (2 μl).
- La Figura 11 muestra la neutralización de los AAB de adrenorreceptor beta 1 por 400 nM de diferentes aptámeros (SEQ ID NO: 31 a 34, 44 y 45) de acuerdo con la invención (2 μl).
- 40 La Figura 12 muestra la neutralización de los AAB de adrenorreceptor beta 1 por 100 nM, 400 nM y 1000 nM de diferentes secuencias de control (SEQ ID NO: 46 a 50) que no están de acuerdo con la invención (2 μl).

La Figura 13 muestra la actividad de AAB de adrenorreceptor beta 1 aislados de pacientes que padecen depresión o miocardiopatía de Chagas (de izquierda a derecha) en ausencia o presencia de 100 nM del aptámero de la invención de SEQ ID NO: 12.

5 La Figura 14 muestra la actividad de AAB de adrenorreceptor beta 2 aislados de pacientes que padecen glaucoma, esquizofrenia, miocardiopatía de Chagas, síndrome urémico hemolítico (EHEC) o enfermedad de Alzheimer (de izquierda a derecha) en ausencia o presencia de 100 nM del aptámero de la invención de SEQ ID NO: 12.

10 La Figura 15 muestra la actividad de AAB de AT1 aislados de pacientes que padecen alopecia, rechazo de aloinjerto de riñón o alta tensión arterial en enfermedad renal (de izquierda a derecha) en ausencia o presencia de 100 nM del aptámero de la invención de SEQ ID NO: 12.

La Figura 16 muestra la actividad de AAB de ETA aislados de pacientes que padecen hipertensión arterial pulmonar, enfermedad de Raynaud, angina de pecho o alta tensión arterial en enfermedad renal (de izquierda a derecha) en ausencia o presencia de 100 nM del aptámero de la invención de SEQ ID NO: 12.

15 La Figura 17 muestra la actividad de AAB de alfa 1 aislados de pacientes que padecen hipertensión arterial pulmonar, quimioterapia, esclerosis múltiple, alopecia, alopecia areata, síndrome urémico hemolítico (EHEC), síndrome de Sjögren, enfermedad de Alzheimer, neurodermatitis, diabetes mellitus de tipo I o psoriasis (de izquierda a derecha) en ausencia o presencia de 100 nM del aptámero de la invención de SEQ ID NO: 12.

20 La Figura 18 muestra la actividad de AAB de PAR aislados de pacientes que padecen enfermedad de Raynaud, angina de pecho o síndrome de Sjögren (de izquierda a derecha) en ausencia o presencia de 100 nM del aptámero de la invención de SEQ ID NO: 12.

La Figura 19 muestra la actividad de AAB de MAS aislados de pacientes que padecen quimioterapia, esclerosis múltiple o diabetes mellitus de Tipo I (de izquierda a derecha) en ausencia o presencia de 100 nM del aptámero de la invención de SEQ ID NO: 12.

25 La Figura 20 muestra la actividad de AAB de 5HT4 aislados de pacientes que padecen depresión, esquizofrenia o migraña/enfermedad de Parkinson (de izquierda a derecha) en ausencia o presencia de 100 nM del aptámero de la invención de SEQ ID NO: 12.

La Figura 21 muestra la actividad de AAB de M2 aislados de pacientes que padecen miocardiopatía de Chagas, alopecia areata, migraña/enfermedad de Parkinson o síndrome de Sjögren (de izquierda a derecha) en ausencia o presencia de 100 nM del aptámero de la invención de SEQ ID NO: 12.

### 30 **Descripción detallada de la invención**

Los presentes inventores han reconocido que los oligonucleótidos que son capaces de interactuar con autoanticuerpos específicos para receptores acoplados a proteína G e interferir con la interacción patógena entre estas dos moléculas comparten patrones moleculares definidos. A partir de este reconocimiento, los inventores han ideado con éxito una gramática definida por el conjunto de normas de producción P de acuerdo con la reivindicación 35 1 que reproducen los patrones estructurales de aptámeros que son agentes de unión eficaces con autoanticuerpos de GPCR.

Hasta ahora, solamente se conocía en la técnica un número muy limitado de aptámeros que parecen interferir con la unión de autoanticuerpos con receptores acoplados a proteína G. El intento de identificar nuevos aptámeros que sean adecuados para el tratamiento y/o diagnóstico de enfermedades autoinmunitarias asociadas con autoanticuerpos contra receptores acoplados a proteína G es muy laborioso y no es nada prometedor para determinar finalmente una secuencia de nucleótidos adecuada, en particular a la vista de los requisitos estrictos para la aplicación farmacéutica de aptámeros en el diagnóstico o la terapia en pacientes humanos. Para este fin, se ha deseado en gran medida proporcionar aptámeros adicionales para su uso contra estas enfermedades autoinmunitarias.

45 Los presentes inventores han identificado ahora por primera vez las similitudes estructurales de aptámeros que son eficaces contra enfermedades asociadas con autoanticuerpos de receptores acoplados a proteína G y fueron capaces de definir un conjunto de normas de producción para definir un conjunto de secuencias de nucleótidos que sean funcionales y eficaces como aptámeros. Por lo tanto, se ha hecho ahora posible por primera vez proporcionar un número mayor de aptámeros que interfieren con autoanticuerpos de GPCR.

50 Un enfoque habitual para identificar secuencias que compartan las mismas propiedades o propiedades casi idénticas es filtrar todas las secuencias que muestren una identidad de secuencia de por ejemplo al menos 80 o 90 % con una secuencia dada que tenga dichas propiedades. La idea detrás de dicho enfoque es que secuencias altamente similares deberían compartir propiedades altamente similares.



Esta relación entre similitud de secuencias y conservación de propiedades funcionales se ha usado y aplicado durante muchos años por ejemplo en el contexto de modelización basada en conocimiento. Sin embargo, se sabe que hay secuencias de nucleótidos o aminoácidos que comparten bajas identidades de secuencias mutuas pero aún tienen propiedades altamente similares. Para reconocer y describir las secuencias que conservan la función a pesar de baja similitud de secuencias, son necesarios procedimientos más sofisticados.

El reconocimiento de los inventores presentado en el presente documento es desarrollar y usar una gramática para reconocer específicamente y definir secuencias válidas y funcionales sin consideración de identidades de secuencia. Usando esta gramática, es posible calcular solamente secuencias que tengan las propiedades de secuencia buscadas específicas. La misma gramática también puede usarse para reconocer específicamente secuencias que tengan la propiedad deseada en un grupo de secuencias arbitrarias.

La precisión de las gramáticas en general se ve reflejada por el hecho de que solamente un carácter erróneo o un carácter en una posición errónea pueden conducir a una secuencia que no puede ser reconocida por la gramática. Esto es altamente relevante para la presente invención y su aplicación. Si hay un nucleótido erróneo en una posición crucial de las secuencias de aptámeros reivindicadas, las secuencias pueden no ser reconocidas por la gramática.

Usando este enfoque, la invención permite excluir específicamente todas las secuencias que no cumplan los criterios de secuencia expuestos por la gramática y por lo tanto conduciría a una incapacidad para unirse con autoanticuerpos de GPCR. Por otro lado, este procedimiento permite calcular y/o filtrar todas las secuencias que cumplan los criterios expuestos independientemente de cualquier complejidad o identidad de secuencia con un molde dado.

Para demostrar que las propiedades funcionales de las secuencias calculadas no están en función de una identidad o similitud de secuencia sino de la gramática (secuencias funcionales con identidades de secuencias mutuas bajas tienen propiedades iguales o altamente similares), las normas de la gramática dada se aplican considerando las condiciones límite para calcular varias secuencias que muestran bajas identidades de secuencias mutuas. No obstante, se demostrará en el presente documento que todas las secuencias producidas de este modo por la gramática tienen las propiedades reivindicadas de unión con autoanticuerpos de GPCR.

La Figura 9 muestra las ID (SEQ ID NO: 25 a 45) de los aptámeros calculados de acuerdo con la invención y sus identidades de secuencias mutuas. Las identidades de secuencias se han determinado usando el software Kalign con valores de penalización de apertura y penalización de extensión ajustados al máximo. Este software se ha descrito en Lassmann y Sonnhammer, Kalign—an accurate and fast multiple sequence alignment algorithm. (2005) BMC bioinformatics 6: 298, Lassmann y col., Kalign2: high-performance multiple alignment of protein and nucleotide sequences allowing external features. (feb 2009) Nucleic acids research 37 (3): 858-65, Goujon y col., A new bioinformatics analysis tools framework at EMBL-EBI. (jul 2010) Nucleic acids research 38 (número en Servidor Web): W695-9, McWilliam y col., Analysis Tool Web Services from the EMBL-EBI. (jul 2013) Nucleic acids research 41 (número de Servidor Web): W597-600 y Li y col., The EMBL-EBI bio-informatics web and programmatic tools framework. (01 jul 2015) Nucleic acids research 43 (W1): W580-4.

De acuerdo con una realización de la presente invención, las identidades entre dos secuencias de nucleótidos pueden determinarse como se ha expuesto anteriormente. De acuerdo con otra realización de la presente invención, las identidades entre dos secuencias de nucleótidos pueden determinarse de acuerdo con uno o más de los documentos citados anteriormente.

Se ha calculado una amplia serie de secuencias reivindicadas diferentes de acuerdo con la invención que abarcan esencialmente el intervalo completo de identidades de secuencias teóricamente posibles. Puede verse a partir de la Figura 9 que las identidades de secuencias mutuas entre secuencias de aptámeros funcionales varían del 90 % (entre SEQ ID NO: 38 y 42 o 40 y 41) al 11 % (entre SEQ ID NO: 28 y 29).

Todas las secuencias pueden calcularse y/o ser reconocidas por las normas dadas de la gramática usando un analizador sintáctico por desplazamiento y reducción como se muestra posteriormente para las secuencias SEQ ID NO: 12, 3, 10 y 15.

Se han usado oligonucleótidos aleatorios que no están de acuerdo con la invención como secuencias de control (SEQ ID NO: 46 a 50). Estas secuencias no son reconocidas por la gramática dada. Los controles muestran una identidad de secuencias con los aptámeros de la invención funcionales en un intervalo del 10 % (entre SEQ ID NO: 30 y 47) al 60 % (entre SEQ ID NO: 39 y 48).

Notablemente, el aptámero de la invención de SEQ ID NO: 28 tiene una identidad de secuencia de 44 % con la secuencia de control SEQ ID NO: 48 que no es funcional como se mostrará posteriormente (véase Ejemplo 11 y Figura 12). Por el contrario, el aptámero de la invención de SEQ ID NO: 29 muestra una identidad de secuencia muy baja de solamente 11 % con SEQ ID NO: 28, mientras que ambas secuencias están activas como se mostrará posteriormente (véase Ejemplos 9 y 10 y Figuras 10 y 11). Este ejemplo que muestra identidades de secuencias muy bajas entre secuencias de la invención e identidades comparativamente mayores con una secuencia no funcional (es decir cuatro veces mayores) indica claramente que la actividad de la secuencia está en función de las similitudes de las secuencias representadas por la gramática y no de la identidad de secuencia.

Estos resultados indican una clara relación entre propiedades de secuencia codificadas por la gramática dada y la capacidad de una secuencia creada o reconocida por ella para inhibir autoanticuerpos. Esta relación no se basa en identidades de secuencias sino en la gramática en sí misma lo que se demostró calculando secuencias activas con identidades de secuencias mutuas muy bajas. De la misma manera, la comparación de la actividad medida de los aptámeros de la invención con los resultados de las secuencias de control confirma los hallazgos con respecto a la función de todas las secuencias de aptámeros reivindicadas en el presente documento.

Los aptámeros de la presente invención se caracterizan por satisfacer una gramática que se define por el conjunto de normas de producción como se definen adicionalmente por la reivindicación 1. Dicha gramática refleja los requisitos estructurales para aptámeros que sean eficaces contra enfermedades autoinmunitarias asociadas con autoanticuerpos contra receptores acoplados a proteína G.

En una realización preferida de la presente invención, el aptámero comprende una secuencia de nucleótidos que satisface una gramática que caracteriza un lenguaje sin contexto (gramática de tipo 2 en la jerarquía de Chomsky) o un lenguaje sensible al contexto (gramática de tipo 1 en la jerarquía de Chomsky) o un lenguaje (enumerable de forma recurrente) que se describe por gramáticas de estructura de frase (gramática de tipo 0 en la jerarquía de Chomsky). En una realización más preferida, el aptámero comprende una secuencia de nucleótidos que satisface una gramática que caracteriza un lenguaje sin contexto (gramática de tipo 2 en la jerarquía de Chomsky).

Para el fin de la presente invención, el término "aptámero" se refiere a un oligonucleótido que se une específicamente y con alta afinidad con una molécula diana. En condiciones definidas, los aptámeros pueden plegarse en una estructura tridimensional específica.

El aptámero de la invención comprende o consiste en una secuencia de moléculas de ácido nucleico, los nucleótidos. De acuerdo con una realización preferida, el aptámero de la invención consiste en una secuencia de nucleótidos que satisface la gramática de acuerdo con la presente invención o que consiste en una secuencia de nucleótidos definida de otro modo en el presente documento.

El aptámero de la invención preferentemente comprende D y/o L nucleótidos no modificados y/o modificados. De acuerdo con el código de una letra común de bases de ácido nucleico "C" significa citosina, "A" significa adenina, "G" significa guanina y "U" significa timina si la secuencia de nucleótidos es una secuencia de ADN y "T" significa un nucleótido de uracilo si la secuencia de nucleótidos es una secuencia de ARN. Si no se indica posteriormente lo contrario, el término "nucleótido" se referirá a ribonucleótidos y desoxirribonucleótidos.

El aptámero de la invención puede comprender o consistir en una secuencia de nucleótidos de ADN o ARN y, por lo tanto, puede denominarse aptámero de ADN o aptámero de ARN, respectivamente. Se entiende que, si el aptámero de la invención comprende una secuencia de nucleótidos de ARN, dentro de los motivos de secuencias especificados a lo largo de la presente invención, "T" significa uracilo.

Para mayor precisión a lo largo de la presente invención, se hace referencia solamente a secuencias de nucleótidos de ADN explícitas. Sin embargo, se entiende que las secuencias de nucleótidos de ARN respectivas también están comprendidas por la presente invención.

De acuerdo con una realización, se prefiere el uso de aptámeros de ADN. Los aptámeros de ADN son habitualmente más estables en plasma que los aptámeros de ARN. Sin embargo, de acuerdo con una realización alternativa, se prefieren aptámeros de ARN.

Los aptámeros de la invención pueden comprender una secuencia de nucleótidos que contiene nucleótidos 2' modificados, por ejemplo nucleótidos 2' fluoro, 2' metoxi, 2' metoxietil y/o 2' amino modificados. El aptámero de la invención también puede comprender una mezcla de desoxirribonucleótidos, desoxirribonucleótidos modificados, ribonucleótidos y/o ribonucleótidos modificados. Respectivamente, las expresiones "nucleótido 2' fluoro modificado", "nucleótido 2' metoxi modificado", "nucleótido 2' metoxietil modificado" y "nucleótido 2' amino modificado" se refieren a ribonucleótidos modificados y desoxirribonucleótidos modificados.

El aptámero de la invención puede comprender modificaciones. Dichas modificaciones abarcan por ejemplo 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 ácido nucleico adicionales. Dichas modificaciones pueden comprender por ejemplo modificaciones 5' y/o 3' PEG o 5' y/o 3' CAP. Como alternativa o además, el aptámero de la invención puede comprender nucleótidos modificados, preferentemente seleccionados de ácidos nucleicos bloqueados, nucleótidos 2' fluoro, 2' metoxi y/o 2' amino modificados.

Los ácidos nucleicos bloqueados (LNA) representan análogos de los nucleótidos de ARN respectivos en los que la conformación se ha fijado. Los oligonucleótidos de ácidos nucleicos bloqueados comprenden uno o más ribonucleósidos bicíclicos, en los que el grupo 2'-OH está conectado con el átomo de carbono C<sub>4</sub> mediante un grupo metileno. Los ácidos nucleicos bloqueados muestran una estabilidad mejorada frente a nucleasas en comparación con los homólogos de aptámeros de ARN no modificados respectivos. Además, las propiedades de hibridación se mejoran lo que permite una potenciación de la afinidad y especificidad del aptámero.

Otra modificación preferida es la adición de una estructura denominada 3' CAP, una 5' CAP y/o de un nucleótido de guanosina modificado (por ejemplo 7-metil-guanosina) al extremo 3' y/o 5' del aptámero. Dicha modificación del extremo 3' y/o 5' tiene el efecto de que el aptámero se protege de una degradación rápida por nucleasas.

5 Como alternativa o además, el aptámero de la invención puede mostrar un extremo 3' o 5' pegilado. Una modificación 3' o 5' PEG comprende la adición de al menos una unidad de polietilenglicol (PEG), preferentemente el grupo de PEG comprende de 1 a 900 grupos de etileno, más preferentemente de 1 a 450 grupos de etileno. En una realización preferida, el aptámero comprende unidades de PEG lineales con HO-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>-H, en la que n es un número entero de 1 a 900, preferentemente n es un número entero de 1 a 450.

10 El aptámero de la invención puede comprender o consistir en una secuencia de ácido nucleico con una cadena principal de fosfotioato o puede estar completamente o en parte configurado como un ácido nucleico peptídico (PNA). Los aptámeros de acuerdo con la presente invención pueden modificarse adicionalmente como se describe en Keefe AD y col., Nat Rev Drug Discov. Jul 2010; 9(7): 537-50 o en Mayer G, Angew Chem Int Ed Engl. 2009; 48(15): 2672-89 o en Mayer, G. y Famulok M., Pharmazie in unserer Zeit 2007; 36: 432-436.

15 Además, los aptámeros pueden encapsularse en vehículos adecuados para proteger su integridad estructural así como para promover su suministro dentro de células. Los vehículos preferidos incluyen liposomas, vesículas lipídicas, micropartículas y similares.

20 Las vesículas lipídicas se asemejan a membranas plasmáticas, y pueden hacerse fusionar con membranas celulares. La mayoría de liposomas y vesículas multilamelares no son fácilmente fusogénicas, principalmente debido a que la energía almacenada del radio de curvatura de la vesícula es mínima. Las vesículas lipídicas preferidas incluyen vesículas unilamelares pequeñas. Las vesículas unilamelares pequeñas contempladas para encapsular los aptámeros de la presente invención son muy fusogénicas, debido a que tienen un radio de curvatura muy estrecho. El diámetro promedio de una vesícula unilamelar pequeña es de 5 nm a 500 nm; preferentemente de 10 nm a 100 nm, más preferentemente de 20 nm a 60 nm, incluyendo 40 nm. Este tamaño permite a las vesículas pasar a través de los huecos entre células endoteliales, permitiendo de este modo el suministro sistémico de vesículas que contienen aptámeros después de administración intravenosa. Las vesículas útiles pueden variar en gran medida en tamaño y se seleccionan de acuerdo con una aplicación específica con un aptámero.

25 Pueden prepararse fácilmente vesículas unilamelares pequeñas *in vitro* usando procedimientos disponibles en la técnica (como por ejemplo desvelados en el documento WO 2005/037323 A2). Las composiciones a partir de las que se forman vesículas contienen un fosfolípido que es un formador de vesículas estable, preferentemente junto con otro lípido polar, y opcionalmente con uno o más lípidos polares y/o formadores de balsas adicionales. Los fosfolípidos preferidos que son formadores de vesículas estables incluyen 1-palmitoil-2-docosaheptaenoil-sn-glicero-3-fosfolina y 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfolina. Los lípidos polares preferidos incluyen: 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfato, 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-etilfosfolina, 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina, 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-[fosfo-l-serina], una esfingomielina típica, 1,2-dimiristoil-sn-glicerol y 1-palmitoil-2-hidroxi-sn-glicero-3-fosfolina.

35 Otros lípidos polares preferidos incluyen fosfatidilserina, fosfatidilglicerol, fosfatidilcolina de cadena mixta, fosfatidiletanol y fosfolípidos que contienen ácidos decosaheptaenoicos. Un ejemplo de un formador de balsa preferido es colesterol.

40 Una ventaja de la modificación del aptámero de la invención por uno de los medios mencionados anteriormente es que el aptámero puede estabilizarse contra influencias perjudiciales como por ejemplo nucleasas presentes en el ambiente en el que se usa el aptámero. Dichas modificaciones también son adecuadas para adaptar las propiedades farmacológicas del aptámero. Las modificaciones preferentemente no alteran la afinidad o especificidad del aptámero.

45 El aptámero de la invención también puede conjugarse con una molécula vehículo y/o con una molécula indicadora. Las moléculas vehículo comprenden moléculas tales que, cuando se conjugan con el aptámero, prolongan la semivida en plasma del aptámero conjugado en plasma humano, por ejemplo potenciando la estabilidad y/o afectando a la tasa de excreción. Un ejemplo de una molécula vehículo adecuada es PEG.

50 Las moléculas indicadoras comprenden moléculas que permiten la detección del aptámero conjugado. Son ejemplos de dichas moléculas indicadoras GFP, biotina, colesterol, colorantes como por ejemplo colorantes fluorescentes, moléculas indicadoras electroquímicamente activas y/o compuestos que comprenden restos radiactivos, en particular radionúclidos adecuados para detección por PET (tomografía de emisión de positrones) como por ejemplo <sup>18</sup>F, <sup>11</sup>C, <sup>13</sup>N, <sup>15</sup>O, <sup>82</sup>Rb o <sup>68</sup>Ga. El experto en la materia es muy consciente de moléculas vehículo e indicadoras adecuadas y de modos para conjugadas con el aptámero de la invención.

55 En una realización preferida, la secuencia de nucleótidos del aptámero de la presente invención tiene una longitud de al menos 4 nucleótidos, más preferentemente al menos 8 nucleótidos, aún más preferentemente de al menos 12 nucleótidos y aún más preferentemente al menos 16 nucleótidos. En otra realización preferida, la secuencia de nucleótidos del aptámero de la presente invención tiene una longitud de como máximo 120 nucleótidos, más preferentemente de como máximo 100 nucleótidos, aún más preferentemente de como máximo 80 nucleótidos y aún

más preferentemente de como máximo 60 nucleótidos. De acuerdo con una realización, la secuencia de nucleótidos del aptámero de la presente invención tiene una longitud de como máximo 40 nucleótidos, en particular de como máximo 20 nucleótidos.

5 De acuerdo con la presente invención, el aptámero no consiste en o comprende cualquiera de las secuencias de nucleótidos GGTTGGTGTGGTTGG (SEQ ID NO: 22), GGTTGGTGTGGT (SEQ ID NO: 23) o CGCCTAGGTTGGGTAGGGTGGTGGCG (SEQ ID NO: 24). Esta condición debería aplicarse a cualquier definición de un aptámero o un grupo de aptámeros de acuerdo con la presente invención como se describe o se define en el presente documento.

10 De acuerdo con una realización preferida, el aptámero de la presente invención no consiste en o comprende cualquiera de las secuencias de nucleótidos SEQ ID NO: 22, 23 o 24 o cualquier secuencia que sea más del 90 % idéntica a cualquiera de las secuencias de nucleótidos SEQ ID NO: 22, 23 o 24. De acuerdo con otra realización preferida, el aptámero de la presente invención no consiste en o comprende cualquiera de las secuencias de nucleótidos SEQ ID NO: 22, 23 o 24 o cualquier secuencia que sea más del 85 % idéntica a cualquiera de las secuencias de nucleótidos SEQ ID NO: 22, 23 o 24. De acuerdo con una realización específica, el aptámero de la presente invención no consiste en o comprende cualquiera de las secuencias de nucleótidos SEQ ID NO: 22, 23 o 24 o cualquier secuencia que sea menos del 80 % idéntica a cualquiera de las secuencias de nucleótidos SEQ ID NO: 22, 23 o 24.

20 De acuerdo con otra realización preferida de la presente invención, forman parte de la invención secuencias de aptámeros que consisten en o comprenden una secuencia de ácido nucleico que sea al menos 85 % idéntica a las secuencias de aptámeros individualizadas que se desvelan en el presente documento, más preferentemente al menos 90 % idéntica, aún más preferentemente al menos 95 % idéntica.

25 La determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias se consigue de acuerdo con la presente invención usando el algoritmo matemático de Karlin y Altschul (Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1993) 90: 5873-5877). Dicho algoritmo es la base de los programas BLASTN y BLASTP de Altschul y col. (J. Mol. Biol. (1990) 215: 403-410). Se realizan búsquedas de nucleótidos BLAST con el programa BLASTN. Para obtener alineamientos con huecos para fines comparativos, se utiliza BLAST con huecos como se describe en Altschul y col. (Nucleic Acids Res. (1997) 25: 3389-3402). Cuando se utilizan los programas BLAST y BLAST con huecos, se usan los parámetros por defecto de los programas respectivos.

30 De acuerdo con una realización preferida de la presente invención, la secuencia de nucleótidos comprendida en el aptámero es una cualquiera de las siguientes secuencias: (5'-GTTGTTGGGGTGG-3' SEQ ID NO: 1), (5'-GTTGTTGGGGTGGT-3' SEQ ID NO: 2), (5'-GGTTGGGGTGGGTGGGGTGGG-3' SEQ ID NO: 3), (5'-TTTGGTGGTGGTGGTTGTGGTGGTGGTGG-3' SEQ ID NO: 4), (5'-TTTGGTGGTGGTGGTTGTGGTGGTGGTGG-3' SEQ ID NO: 5), (5'-TTTGGTGGTGGTGGTTTTGGTGGTGGTGG-3' SEQ ID NO: 6), (5'-TTTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGG-3' SEQ ID NO: 7), (5'-TTTGGTGGTGGTGGTTGGGTGGTGGTGG-3' SEQ ID NO: 8), (5'-TGGTGGTGGTGGT-3' SEQ ID NO: 9), (5'-GGTGGTGGTGG-3' SEQ ID NO: 10), (5'-GGTGGTTGTGGTGG-3' SEQ ID NO: 11), (5'-GGTGGTGGTGGTTGTGGTGGTGGTGG-3' SEQ ID NO: 12), (5'-GGTGGTGGTGGTTGTGGTGGTGGTGGTTGTGGTGGTGGTGGTGG-3' SEQ ID NO: 13), (5'-GGTGGTGGTGGTGGTTGTGGTGGTGGTGGTGG-3' SEQ ID NO: 14), (5'-TTTGGTGGTGGTGGTTGTGGTGGTGGTGGTTT-3' SEQ ID NO: 15), (5'-GGTGGTGGTGGTTGTGGTGGTGGTGGTTT-3' SEQ ID NO: 16), (5'-TTTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGG-3' SEQ ID NO: 17), (5'-TGGTGGTGGT-3' SEQ ID NO: 18), (5'-TTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG (SEQ ID NO: 20). De acuerdo con otra realización preferida, el aptámero de la invención tiene una de las secuencias de nucleótidos anteriormente mencionadas.

45 De acuerdo con una realización más preferida, la secuencia de nucleótidos comprendida en el aptámero es una cualquiera de las siguientes secuencias: (5'-GTTGTTGGGGTGGT-3' SEQ ID NO: 2), (5'-GGTTGGGGTGGGTGGGGTGGGTGGG-3' SEQ ID NO: 3), (5'-GGTGGTGGTGG-3' SEQ ID NO: 10), (5'-GGTGGTGGTGGTTGTGGTGGTGGTGG-3' SEQ ID NO: 12), (5'-TTTGGTGGTGGTGGTTGTGGTGGTGGTGGTTT-3' SEQ ID NO: 15). De acuerdo con otra realización más preferida, el aptámero de la invención tiene una de las secuencias de nucleótidos anteriormente mencionadas.

55 De acuerdo con una realización particularmente preferida, el aptámero comprende la secuencia de nucleótidos (5'-GGTGGTGGTGGTTGTGGTGGTGGTGG-3' SEQ ID NO: 12). De acuerdo con otra realización particularmente preferida, el aptámero tiene la secuencia de nucleótidos (5'-GGTGGTGGTGGTTGTGGTGGTGGTGG-3' SEQ ID NO: 12).

De acuerdo con una realización preferida diferente de la presente invención, la secuencia de nucleótidos comprendida en el aptámero es una cualquiera de las siguientes secuencias: (5'-GCGGTGGTGGGATGGGTTGGATCCGC-3' SEQ ID NO: 25), (5'-GGGTCGGGATCTAGGGTCAGG-3' SEQ ID NO: 26), (5'-GGTGGGTCGGTAGGGTTT-3' SEQ ID NO: 27), (5'-TTGGCTGGATCGGACGGT-3' SEQ ID NO: 28),

(5'-GGTCGGGTTCCGGTGGTTA-3' SEQ ID NO: 29), (5'-GGGATCGGTTCCGGTAGGTGGGTGGGTTGG-3' SEQ ID NO: 30), (5'-GGCCGGCGCGGCCGG-3' SEQ ID NO: 31), (5'-GGAAGGATCGGAAGG-3' SEQ ID NO: 32), (5'-GGTAGGCTCGGTAGG-3' SEQ ID NO: 33), (5'-GGATGGTTAGGATGG-3' SEQ ID NO: 34), (5'-CCGTCGGTCCGTTCCGGTATTTTTTCTGGGTGGCTGAGGATCG-3' SEQ ID NO: 35), (5'-GGGTTGGTCCGTTGGGTATTTTTTATGGGTTGCCTGGTTGGG-3' SEQ ID NO: 36), (5'-TCCCATCGGGTAGGGTATTTGGGTTCTGGGTGGCTGAGGATCGATC-3' SEQ ID NO: 37), (5'-TGGCGGTGGT-3' SEQ ID NO: 38), (5'-TGGAGGTGGA-3' SEQ ID NO: 39), (5'-AGGTGGTGGGA-3' SEQ ID NO: 40), (5'-AGGTGGCGGA-3' SEQ ID NO: 41), (5'-GTGGTGGTGGTGTGGTGGTGGTGGG-3' SEQ ID NO: 42), (5'-TGGGTTGGGTTGTTGTTGTTGGGTTGGGT-3' SEQ ID NO: 43), (5'-GGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGG-3' SEQ ID NO: 44), (5'-CTGGGGTTGGGTTTGGTTTTGTTTTGTTTTGGTTGGGGTC-3' SEQ ID NO: 45). De acuerdo con otra realización preferida, el aptámero de la invención tiene una de las secuencias de nucleótidos anteriormente mencionadas.

De acuerdo con una realización más preferida, la secuencia de nucleótidos comprendida en el aptámero es una cualquiera de las siguientes secuencias: 5'-GGTGGGTCGGTAGGGTTT-3' SEQ ID NO: 27), (5'-TTGGCTGGATCGGACGGT-3' SEQ ID NO: 28), (5'-GGTCGGGTTCCGGTGGTTA-3' SEQ ID NO: 29), (5'-TGGCGGTGGT-3' SEQ ID NO: 38), (5'-TGGAGGTGGA-3' SEQ ID NO: 39), (5'-AGGTGGTGGGA-3' SEQ ID NO: 40), (5'-AGGTGGCGGA-3' SEQ ID NO: 41). De acuerdo con otra realización más preferida, al aptámero de la invención tiene una de las secuencias de nucleótidos anteriormente mencionadas.

De acuerdo con otra realización más preferida, la secuencia de nucleótidos comprendida en el aptámero es una cualquiera de las siguientes secuencias: 5'-GGTGGGTCGGTAGGGTTT-3' SEQ ID NO: 27), (5'-GGTCGGGTTCCGGTGGTTA-3' SEQ ID NO: 29), (5'-TGGCGGTGGT-3' SEQ ID NO: 38), (5'-TGGAGGTGGA-3' SEQ ID NO: 39), (5'-AGGTGGTGGGA-3' SEQ ID NO: 40), (5'-AGGTGGCGGA-3' SEQ ID NO: 41). De acuerdo con otra realización más preferida, el aptámero de la invención tiene una de las secuencias de nucleótidos anteriormente mencionadas.

De acuerdo con otra realización más preferida, la secuencia de nucleótidos comprendida en el aptámero es una cualquiera de las siguientes secuencias: 5'-GGTGGGTCGGTAGGGTTT-3' SEQ ID NO: 27), (5'-GGTCGGGTTCCGGTGGTTA-3' SEQ ID NO: 29), (5'-TGGCGGTGGT-3' SEQ ID NO: 38), (5'-TGGAGGTGGA-3' SEQ ID NO: 39). De acuerdo con otra realización más preferida, el aptámero de la invención tiene una de las secuencias de nucleótidos anteriormente mencionadas.

De acuerdo con una realización particularmente preferida, el aptámero comprende la secuencia de nucleótidos (5'-TGGCGGTGGT-3' SEQ ID NO: 38). De acuerdo con otra realización particularmente preferida, el aptámero tiene la secuencia de nucleótidos (5'-TGGCGGTGGT-3' SEQ ID NO: 38).

Los aptámeros de la presente invención son útiles para el tratamiento y/o el diagnóstico de enfermedades autoinmunitarias asociadas con autoanticuerpos contra receptores acoplados a proteína G. En el contexto de la presente invención, los aptámeros se consideran útiles para sujetos humanos así como para sujetos animales. De acuerdo con una realización, los aptámeros son para uso en sujetos humanos. De acuerdo con otra realización, los aptámeros son para uso en sujetos animales. De acuerdo con una realización preferida, los aptámeros de la presente invención son para uso en el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias como se define en el presente documento.

Las enfermedades que están asociadas con autoanticuerpos contra receptores acoplados a proteína G son enfermedades en las que dichos autoanticuerpos pueden detectarse en un paciente afectado por dicha enfermedad usando procedimientos convencionales como se conoce en la técnica. De acuerdo con una realización preferida, las enfermedades están provocadas por autoanticuerpos contra receptores acoplados a proteína G. De acuerdo con una realización, el estado de un paciente en el que pueden detectarse autoanticuerpos contra receptores acoplados a proteína G pero no son evidentes síntomas adicionales puede considerarse una enfermedad autoinmunitaria asociada con autoanticuerpos contra receptores acoplados a proteína G.

Por lo tanto, los aptámeros de la presente invención son preferentemente para uso en el tratamiento de pacientes que tienen anticuerpos contra un receptor acoplado a proteína G en un líquido corporal. De acuerdo con una realización preferida de la presente invención, los pacientes para tratar o diagnosticar usando los aptámeros de la presente invención son pacientes en los que pueden detectarse anticuerpos contra receptores acoplados a proteína G.

Ya se ha indicado o se conoce en la bibliografía que varias enfermedades están asociadas con autoanticuerpos contra receptores acoplados a proteína G. Los presentes inventores han realizado investigación adicional a la vista de dicha asociación y han descubierto que más enfermedades de lo que se había indicado previamente están asociadas con dichos autoanticuerpos (datos no mostrados).

Debido a la afinidad de los aptámeros reivindicados por autoanticuerpos de GPCR, es plausible que cualquier enfermedad que esté asociada con la presencia de dichos autoanticuerpos se trate eficazmente con los aptámeros

presentados y reivindicados en el presente documento. Por lo tanto, de acuerdo con una realización preferida de la presente invención, las enfermedades autoinmunitarias son una de miocardiopatía, miocardiopatía dilatada (MCD), miocardiopatía isquémica (MCi), miocardiopatía del periparto (MCPP), miocardiopatía idiopática, miocardiopatía de Chagas, miocardiopatía inducida por quimioterapia, megacolon de Chagas, megaesófago de Chagas, neuropatía de Chagas, hiperplasia prostática benigna, esclerodermia, síndrome de Raynaud, enfermedad oclusiva arterial periférica (EOAP), preeclampsia, rechazo de aloinjerto de riñón, miocarditis, glaucoma, hipertensión, hipertensión pulmonar, hipertensión maligna, síndrome metabólico, alopecia, alopecia areata, migraña, enfermedad de Parkinson, epilepsia, cefalea en racimo, esclerosis múltiple, depresión, síndrome de dolor regional, angina de pecho inestable, lupus eritematoso sistémico (LES), esquizofrenia, síndrome de Sjögren, periodontitis, fibrilación auricular, vitíligo, síndrome urémico hemolítico, síndrome de la persona rígida, bloqueo cardíaco congénito, diabetes mellitus de tipo I, psoriasis, enfermedad de Alzheimer, fatiga, neurodermatitis, enfermedad renal, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), neuropatía óptica hereditaria de Leber (síndrome de NOHL), asma alérgica, arritmia, hipertensión refractaria, diabetes mellitus de tipo II, demencia vascular, megacolon no de Chagas y/o hipertensión ortostática.

Aunque los datos presentados en el presente documento demuestran la asociación para una amplia serie de enfermedades con las moléculas diana de los aptámeros de acuerdo con la invención, en principio los inventores han reconocido que todas las enfermedades mencionadas en el presente documento están asociadas con autoanticuerpos contra receptores acoplados a proteína G y son por lo tanto enfermedades diana prometedoras para tratar con los aptámeros de acuerdo con la presente invención.

De acuerdo con una realización preferida de la presente invención, la enfermedad autoinmunitaria es una de miocardiopatía, miocardiopatía dilatada (MCD), miocardiopatía isquémica (MCi), miocardiopatía del periparto (MCPP), miocardiopatía idiopática, miocardiopatía de Chagas, miocardiopatía inducida por quimioterapia, megacolon de Chagas, megaesófago de Chagas, neuropatía de Chagas, hiperplasia prostática benigna, esclerodermia, síndrome de Raynaud, enfermedad oclusiva arterial periférica (EOAP), preeclampsia, rechazo de aloinjerto de riñón, miocarditis, glaucoma, hipertensión, hipertensión pulmonar, hipertensión maligna, síndrome metabólico, alopecia, alopecia areata, migraña, enfermedad de Parkinson, epilepsia, cefalea en racimo, esclerosis múltiple, depresión, síndrome de dolor regional, angina de pecho inestable, lupus eritematoso sistémico (LES), esquizofrenia, síndrome de Sjögren, periodontitis, fibrilación auricular, vitíligo, síndrome urémico hemolítico, síndrome de la persona rígida y/o bloqueo cardíaco congénito, más preferentemente la enfermedad autoinmunitaria es miocardiopatía dilatada (MCD).

De acuerdo con otra realización de la presente invención, la enfermedad autoinmunitaria es una enfermedad cardíaca, una enfermedad neurológica, una enfermedad vascular, una enfermedad de tejido conectivo (ETC), una enfermedad de la piel o una enfermedad de Chagas, en particular la enfermedad autoinmunitaria es una enfermedad cardíaca, una enfermedad neurológica o una enfermedad vascular. De acuerdo con una realización particular, la enfermedad autoinmunitaria es una enfermedad cardíaca.

Una enfermedad cardíaca dentro del significado de la presente invención puede ser miocardiopatía, miocardiopatía dilatada, miocardiopatía isquémica, miocardiopatía idiopática, miocardiopatía del periparto, miocardiopatía de Chagas, fibrilación auricular, miocarditis aguda y crónica, bloqueo cardíaco congénito, angina de pecho inestable, miocardiopatía inducida por quimioterapia o miocardiopatía hipertrófica.

Una enfermedad neurológica dentro del significado de la presente invención puede ser migraña, depresión, epilepsia, enfermedad de Parkinson, esclerosis múltiple, cefalea en racimo, esquizofrenia, síndrome de la persona rígida, neuropatía de Chagas o síndrome de dolor regional complejo.

Una enfermedad vascular dentro del significado de la presente invención puede ser hipertensión, hipertensión pulmonar, enfermedad oclusiva arterial periférica, hipertensión maligna o síndrome de Raynaud.

Una enfermedad del tejido conectivo (ETC) dentro del significado de la presente invención puede ser esclerodermia, lupus eritematoso sistémico LES o síndrome de Sjögren. Una enfermedad cutánea dentro del significado de la presente invención puede ser alopecia areata, alopecia o vitíligo. Una enfermedad de Chagas dentro del significado de la presente invención puede ser megacolon de Chagas o megaesófago de Chagas.

En una realización alternativa, la enfermedad autoinmunitaria es una de glaucoma, síndrome metabólico, periodontitis, síndrome urémico hemolítico, preeclampsia, hiperplasia prostática benigna o rechazo de aloinjerto de riñón.

De acuerdo con otra realización alternativa, la enfermedad autoinmunitaria es una de miocardiopatía dilatada, miocardiopatía idiopática, miocarditis aguda y crónica, miocardiopatía de Chagas, miocardiopatía del periparto, hipertensión pulmonar, hipertensión, preeclampsia, hipertensión maligna, angina de pecho inestable, miocardiopatía isquémica, migraña, depresión, esclerosis múltiple, enfermedad de Parkinson o epilepsia, en particular una de miocardiopatía dilatada, miocardiopatía idiopática, miocarditis aguda y crónica, miocardiopatía de Chagas, miocardiopatía del periparto, hipertensión pulmonar o hipertensión, opcionalmente una de miocardiopatía dilatada, miocardiopatía idiopática o miocarditis aguda y crónica.

En particular, los aptámeros de la presente invención son capaces de interactuar con un autoanticuerpo, preferentemente un autoanticuerpo que es específico para un receptor acoplado a proteína G, preferentemente

específico de uno cualquiera de los receptores acoplados a proteína G humanos, receptor alfa 1 adrenérgico, receptor beta 1 adrenérgico, receptor beta 2 adrenérgico, receptor de endotelina 1 ETA, receptor muscarínico M2, receptor de angiotensina II AT1, receptores PAR, receptor de MAS, receptor de 5HT4 y/o receptor M3 y más preferentemente capaces de inhibir la interacción específica de estos anticuerpos con sus proteínas diana.

5 En el presente documento, el receptor beta1 adrenérgico también puede estar indicado como receptor beta1,  $\beta$ 1-AR o beta1-R. Además, el receptor beta2 adrenérgico también puede estar indicado como receptor beta1,  $\beta$ 2-AR o beta2-R. Además, el receptor de angiotensina II, tipo I puede denominarse receptor de angiotensina II AT1, receptor de angiotensina AT1 o AT1-R. El receptor de endotelina 1 ETA puede estar indicado como ETA-R o ETA-1-R y el receptor alfa1 adrenérgico también puede estar indicado como receptor alfa1,  $\alpha$ 1-AR o alfa1-R. Los receptores  
10 activados por proteasa pueden denominarse PARR. El receptor de unión a metabolito de angiotensina II angiotensina (1-7) puede denominarse en el presente documento receptor acoplado a proteína G relacionado con mas A, receptor de MAS, MAS-R o MAS1. El receptor de 5-hidroxitriptamina 4 puede abreviarse a 5HT4-R mientras que los receptores muscarínicos pueden indicarse como M<sub>x</sub>-R indicando la x el subtipo del receptor muscarínico.

15 De acuerdo con una realización de la presente invención, se pretende que el receptor muscarínico M abarque el receptor M1, M2, M3 y/o M4. De acuerdo con otra realización, los receptores muscarínicos M1, M2, M3 y/o M4 son útiles como ejemplos específicos donde se proporciona el receptor M3 como un ejemplo de un receptor acoplado a proteína G contra el que pueden dirigirse autoanticuerpos.

20 Como se muestra posteriormente de forma ejemplar para el aptámero que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 12, los aptámeros de la presente invención pueden usarse para neutralizar el espectro completo de autoanticuerpos específicos para receptores acoplados a proteína G. En los Ejemplos 12 a 20 del presente documento, se muestra que este aptámero neutraliza específicamente diversos autoanticuerpos tomados de pacientes que padecen enfermedades autoinmunitarias asociadas con estos autoanticuerpos (véase Figuras 13 a 21). Por lo tanto, es plausible que los aptámeros de acuerdo con la invención sean capaces de neutralizar autoanticuerpos contra  
25 receptores acoplados a proteína G y por lo tanto sean eficaces en el tratamiento de enfermedades en las que dichos autoanticuerpos están presentes en un paciente que padece dicha enfermedad.

30 Inhibiendo el comportamiento patológico de los autoanticuerpos dirigidos contra los receptores acoplados a proteína G, el efecto neutralizante de los aptámeros de la invención disminuye, o incluso anula la activación permanente de los receptores acoplados a proteína G respectivos. Como consecuencia, no hay necesidad de una retirada complicada de estos anticuerpos. Por lo tanto, la presente invención proporciona una colección de compuestos que son adecuados para su uso en el tratamiento y/o el diagnóstico de enfermedades autoinmunitarias asociadas con la presencia de autoanticuerpos que reconocen receptores acoplados a proteína G, concretamente enfermedades autoinmunitarias asociadas con la presencia de autoanticuerpos específicos para receptor alfa 1 adrenérgico, receptor beta 1 adrenérgico, receptor beta 2 adrenérgico, receptor de endotelina 1 ETA, receptor muscarínico M2, receptor de angiotensina II AT1, receptores PAR, receptor de MAS, receptor de 5HT4 y/o receptor M3.

35 Además, después de la inmovilización, los aptámeros de la presente invención son capaces de capturar o inmovilizar los autoanticuerpos indicados anteriormente. Por lo tanto, se proporciona una plataforma para establecer una tecnología de aféresis para eliminar del suero del paciente los autoanticuerpos y desarrollar una herramienta analítica para la medición de los autoanticuerpos. Esto último puede usarse en particular para el diagnóstico de enfermedades autoinmunitarias.

40 De acuerdo con una realización preferida, los aptámeros de la presente invención son para su uso en el diagnóstico de una enfermedad autoinmunitaria como se define en el presente documento. En particular, los aptámeros son para su uso en detección *in vitro* de un anticuerpo que es específico para un receptor acoplado a proteína G, preferentemente el receptor acoplado a proteína G humano receptor alfa 1 adrenérgico, receptor beta 1 adrenérgico, receptor beta 2 adrenérgico, receptor de endotelina 1 ETA, receptor muscarínico M, receptor de angiotensina II AT1,  
45 receptores PAR, receptor de MAS, receptor de 5HT4 y/o receptor M3. De acuerdo con otra realización preferida, los aptámeros de la presente invención son para su uso en diagnóstico *in vivo* de una enfermedad autoinmunitaria como se define en el presente documento. De acuerdo con una realización más preferida, el anticuerpo para detectar es un autoanticuerpo.

50 Como se usa en el presente documento, "autoanticuerpo" significa un anticuerpo formado en respuesta a, y que reacciona contra, un constituyente antigénico de los propios tejidos de un paciente. Dicho anticuerpo puede atacar las células, los tejidos o las proteínas nativas del organismo en el que se ha formado y está habitualmente afiliado con un proceso patógeno en dicho organismo.

55 De acuerdo con una realización preferida, el anticuerpo que es específico para un receptor acoplado a proteína G está presente en o se obtiene de un líquido corporal, preferentemente un fluido de un cuerpo humano, más preferentemente de sangre, plasma, suero, orina, heces, líquido sinovial, líquido intersticial, linfa, saliva, líquido cefalorraquídeo y/o líquido lacrimal humano. Más preferentemente, el líquido 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 suero del paciente de autoanticuerpos específicos para un receptor acoplado a proteína G, más preferentemente enfermedades autoinmunitarias asociadas con presencia en el suero

del paciente de autoanticuerpos específicos para receptor alfa 1 adrenérgico, receptor beta 1 adrenérgico, receptor beta 2 adrenérgico, receptor de endotelina 1 ETA, receptor muscarínico M, receptor de angiotensina II AT1, receptores PAR, receptor de MAS, receptor de 5HT4 y/o receptor M3. Cuando se usa para el tratamiento o diagnóstico de una enfermedad inmunitaria no es necesario que el aptámero se administre necesariamente a un individuo o paciente. El efecto terapéutico o de diagnóstico también puede conseguirse mediante el uso del aptámero de la invención para eliminación de anticuerpos, como por ejemplo autoanticuerpos del cuerpo o de fluidos corporales.

Dicha eliminación puede comprender la aplicación del aptámero de la invención en una situación en la que el aptámero de la invención se pone en contacto con un líquido corporal solamente *ex vivo*, por ejemplo durante la adsorción inmunitaria y/o aféresis, de modo que el aptámero de la invención no entre en el cuerpo del individuo o paciente para tratar. Por lo tanto, la presente invención también se dirige a una columna de aféresis que comprende un aptámero de la presente 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 particular y devuelve el resto de vuelta a la circulación del donante o paciente. Por lo tanto, se realiza aféresis uniendo el plasma del paciente, el cuerpo del paciente y el medio que consigue el efecto terapéutico, es decir el aptámero unido a la columna, en un circuito cerrado. El aptámero de la invención puede usarse 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 sangre a la que se dirige específicamente el aptámero de la invención.

Preferentemente el aptámero de la invención se usa para el tratamiento y/o diagnóstico de una enfermedad autoinmunitaria, en el que la enfermedad autoinmunitaria es miocardiopatía, miocardiopatía dilatada (MCD), miocardiopatía isquémica (MCI), miocardiopatía del periparto (MCPP), miocardiopatía idiopática, miocardiopatía de Chagas, miocardiopatía inducida por quimioterapia, megacolon de Chagas, megaesófago de Chagas, neuropatía de Chagas, hiperplasia prostática benigna, esclerodermia, síndrome de Raynaud, enfermedad oclusiva arterial periférica (EOAP), preeclampsia, rechazo de aloinjerto de riñón, miocarditis, glaucoma, hipertensión, hipertensión pulmonar, hipertensión maligna, síndrome metabólico, alopecia, alopecia areata, migraña, enfermedad de Parkinson, epilepsia, cefalea en racimo, esclerosis múltiple, depresión, síndrome de dolor regional, angina de pecho inestable, lupus eritematoso sistémico (LES), esquizofrenia, síndrome de Sjögren, periodontitis, fibrilación auricular, vitíligo, síndrome urémico hemolítico, síndrome de la persona rígida y/o bloqueo cardíaco congénito. Preferentemente además, el aptámero de la invención se usa como ingrediente selectivo para aféresis terapéutica de sangre o partes de la misma derivada de un paciente que padece una enfermedad autoinmunitaria como se define adicionalmente en el presente documento.

La presente invención también se refiere a un aptámero de la invención acoplado a un soporte sólido. El experto en la materia conoce bien técnicas y materiales que pueden usarse 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.

Dicho material sólido comprende polímeros que se usan habitualmente como soporte en ensayos médicos, bioquímicos o biológicos. En particular, el aptámero de la invención puede acoplarse a un soporte sólido que permite el uso del producto resultante en la fabricación de una columna adecuada para aféresis, preferentemente una columna que es adecuada para su uso en una aféresis para retirar anticuerpos específicos para un receptor acoplado a proteína G de una muestra líquida, preferentemente de un líquido corporal.

La fabricación o producción en masa de aptámeros de la invención se conoce bien en la técnica y representa una mera actividad rutinaria.

La presente invención también se dirige a una composición farmacéutica que comprende al menos un aptámero de la invención y, opcionalmente, al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable. La invención también se dirige a una composición farmacéutica que comprende un aptámero de la invención o una mezcla de diferentes aptámeros de la invención y un excipiente farmacéuticamente aceptable como por ejemplo un vehículo o diluyente adecuado.

Preferentemente, el aptámero de la invención constituye un principio activo de la composición farmacéutica y/o está presente en una cantidad eficaz. La expresión "cantidad eficaz" indica una cantidad del aptámero de la invención que tiene un efecto profiláctico, diagnóstica o terapéuticamente relevante en una enfermedad o afección patológica. Un efecto profiláctico evita el brote de una enfermedad. Un efecto terapéuticamente relevante alivia en algún grado uno o más síntomas de una enfermedad o devuelve a la normalidad parcial o completamente uno o más parámetros fisiológicos o bioquímicos asociados con o causantes de la enfermedad o afecciones patológicas.

La cantidad respectiva para administrar el aptámero de la invención es suficientemente alta para conseguir el efecto profiláctico, de diagnóstico o terapéutico deseado. El experto en la materia entenderá que el nivel de dosis específico, la frecuencia y el periodo de administración a cualquier mamífero particular dependerá de una diversidad de factores incluyendo la actividad de los componentes específicos empleados, la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo, la dieta, el momento de administración, la vía de administración, la combinación farmacológica y la



gravedad de la terapia específica. Usando procedimientos y medios bien conocidos, un experto en la materia puede determinar la cantidad exacta como experimentación rutinaria.

5 De acuerdo con una realización de la composición farmacéutica de la invención al menos 20 % del contenido de aptámero total está compuesto de un aptámero de la invención, preferentemente al menos 50 %, más preferentemente al menos 75 %, más preferentemente al menos 95 %.

10 Cuando se usa para terapia, la composición farmacéutica se administrará en general 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 de la invención. La elección de excipiente dependerá en gran medida del modo particular de administración. Los excipientes pueden ser vehículos y/o diluyentes adecuados.

La composición farmacéutica de la invención puede administrarse por vía oral. La administración oral puede implicar tragar, de modo que la composición entre en el tracto gastrointestinal, o puede emplearse administración bucal o sublingual por la que la composición entra en el torrente sanguíneo directamente desde la boca.

15 Las formulaciones adecuadas para administración oral incluyen: formulaciones sólidas tales como comprimidos; comprimidos recubiertos, cápsulas que contienen partículas, líquidos o polvos; pastillas para chupar (incluyendo rellenas de líquido); y caramelos masticables; multi y nanopartículas; geles; soluciones sólidas; liposomas; películas, óvulos, pulverizaciones y formulaciones líquidas.

20 Las formulaciones líquidas incluyen suspensiones, soluciones, jarabes y elixires. Dichas formulaciones pueden emplearse como cargas en cápsulas blandas o duras y típicamente comprenden un vehículo, por ejemplo, agua, etanol, polietilenglicol, propilenglicol, metilcelulosa o un aceite adecuado, y uno o más agentes emulsionantes y/o agentes de suspensión. Las formulaciones líquidas también pueden prepararse por la reconstitución de un sólido, por ejemplo, a partir de un sobrecito.

25 Para formas farmacéuticas en comprimido, dependiendo de la dosis, el aptámero de la invención puede componer del 0,1 % en peso al 80 % en peso de la forma farmacéutica, más típicamente del 5 % en peso al 60 % en peso de la forma farmacéutica. Además del aptámero de la invención, los comprimidos generalmente contienen un disgregante.

Los ejemplos de disgregantes incluyen glicolato de almidón sódico, carboximetilcelulosa sódica, carboximetilcelulosa de calcio, croscarmelosa sódica, crospovidona, polivinilpirrolidona, metilcelulosa, celulosa microcristalina, hidroxipropilcelulosa alquil sustituida inferior, almidón, almidón pregelatinizado y alginato sódico.

30 En general, el disgregante comprenderá del 1 % en peso al 25 % en peso, preferentemente del 5 % en peso al 20 % en peso de la forma farmacéutica.

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

35 Las mezclas de comprimido pueden comprimirse directamente o por rodillo para formar comprimidos. Las mezclas o partes de mezclas de comprimidos pueden como alternativa granularse en forma húmeda, seca o fundida, coagularse en forma fundida o extruirse antes de la formación de comprimidos. La formulación final puede comprender una o más capas y puede estar revestida o no revestida; puede estar incluso encapsulada.

40 Pueden formularse formulaciones sólidas para administración oral para que sean de liberación inmediata y/o modificada. Las formulaciones de liberación modificada incluyen liberación retardada, sostenida, por pulsos, controlada, dirigida y programada.

45 La composición farmacéutica de la invención también puede administrarse directamente al torrente sanguíneo, al músculo o a un órgano interno. Los medios adecuados para administración parenteral incluyen intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, intratecal, intraventricular, intracisternal, intracraneal, intramuscular y subcutánea. Los dispositivos adecuados para administración parenteral incluyen inyectores de aguja (incluyendo microaguja), inyectores sin aguja y técnicas de infusión.

Las formulaciones parenterales son típicamente soluciones acuosas que pueden contener excipientes tales como sales, carbohidratos y agentes tamponantes (preferentemente hasta un pH de 3 a 9), pero, para algunas aplicaciones, pueden formularse más convenientemente como una solución no acuosa estéril o como una forma seca para usar junto con un vehículo adecuado tal como agua sin pirógenos, estéril.

50 La preparación de formulaciones parenterales en condiciones estériles, por ejemplo, por liofilización, puede conseguirse fácilmente usando técnicas farmacéuticas convencionales bien conocidas por los expertos en la materia.

La solubilidad de la composición farmacéutica de la invención usada en la preparación de soluciones parenterales puede aumentarse mediante el uso de técnicas de formulación apropiadas, tales como la incorporación de agentes

potenciadores de la solubilidad.

Las formulaciones para administración parenteral pueden formularse para que sean de liberación inmediata y/o modificada. Las formulaciones de liberación modificada incluyen liberación retardada, sostenida, por pulsos, controlada, dirigida y programada. Por lo tanto los compuestos de la invención pueden formularse como un sólido, semisólido o líquido tixotrópico para administración como un depósito implantado que proporciona liberación modificada del compuesto activo. Los ejemplos de dichas formulaciones incluyen estents revestidos con fármaco y microesferas de ácido poli(di-láctico-coglicólico) PGLA (PGLA).

La composición farmacéutica de la invención también puede administrarse por vía tópica a la piel o la mucosa, es decir, por vía dérmica o transdérmica. Las formulaciones típicas para este fin incluyen geles, hidrogeles, lociones, soluciones, cremas, pomadas, polvos de uso externo, apósitos, espumas, películas, parches cutáneos, obleas, implantes, esponjas, fibras, vendas y microemulsiones.

También pueden usarse liposomas. Los vehículos 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 suministro por electroporación, iontoforesis, fonoforesis, sonoforesis e inyección por microaguja o sin aguja (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, sostenida, por pulsos, controlada, dirigida y programada.

Para administración a pacientes humanos, la dosis diaria total del aptámero de la invención y/o la composición farmacéutica de la invención está típicamente en el intervalo de 0,001 mg a 5.000 mg dependiendo, por supuesto, del modo de administración. Por ejemplo, una dosis diaria intravenosa puede requerir solamente de 0,001 mg a 40 mg. La dosis diaria total puede administrarse en dosis individuales o divididas y puede quedar, al criterio del médico, fuera del intervalo típico proporcionado en el presente documento.

Estas dosificaciones se basan en un sujeto humano promedio que tiene un peso de aproximadamente 75 kg a 80 kg. El médico será capaz de determinar fácilmente dosis para sujetos cuyo peso quede fuera de este intervalo, tales como niños y ancianos.

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

Para el tratamiento y/o diagnóstico de una enfermedad, independientemente de la vía de administración, el aptámero de 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, más preferentemente seleccionada del intervalo de 1 µg/kg a 20 mg/kg de peso corporal, más preferentemente seleccionada de un intervalo de 0,01 a 10 mg/kg de peso corporal.

En una realización, la presente invención se dirige al aptámero de la invención para su uso en la detección *in vitro* y/o caracterización de anticuerpos, como por ejemplo autoanticuerpos, que son específicos para un receptor acoplado a proteína G, preferentemente los receptores acoplados a proteína G receptor alfa 1 adrenérgico, receptor beta 1 adrenérgico, receptor beta 2 adrenérgico, receptor de endotelina 1 ETA, receptor muscarínico M2, receptor de angiotensina II AT1, receptores PAR, receptor de MAS, receptor de 5HT4 y/o receptor M3. En consecuencia, una realización preferida de la presente invención se dirige al uso de un aptámero como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para la detección *in vitro* de un anticuerpo que es específico para un receptor acoplado a proteína G, preferentemente el receptor acoplado a proteína G humano receptor alfa 1 adrenérgico, receptor beta 1 adrenérgico, receptor beta 2 adrenérgico, receptor de endotelina 1 ETA, receptor muscarínico M, receptor de angiotensina II AT1, receptores PAR, receptor de MAS, receptor de 5HT4 y/o receptor M3.

Dicho uso puede comprender el ensayo de una muestra en un ensayo de frecuencia de latido de cardiomiocito de rata en presencia y ausencia de una cantidad eficaz de un aptámero de la invención. Dependiendo del efecto de la muestra y el aptámero de la invención en la frecuencia de latido, el experto en la materia puede concluir la presencia de anticuerpos respectivos. También pueden obtenerse datos sobre la cantidad total o relativa de dichos anticuerpos en la muestra así como otras propiedades de dichos anticuerpos.

En el denominado ensayo de frecuencia de latido de cardiomiocito de rata es un ensayo bien establecido para la detección y caracterización de anticuerpos, por ejemplo autoanticuerpos derivados de pacientes, específicos para varios receptores acoplados a proteína G humanos como por ejemplo receptor alfa 1 adrenérgico, receptor beta 1 adrenérgico, receptor beta 2 adrenérgico, receptor de endotelina 1 ETA, receptor muscarínico M2, receptor de angiotensina II AT1, receptores PAR, receptor de MAS, receptor de 5HT4 y/o receptor M3.

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. 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, 145149; 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. Col. Cardiol. 55, 463 - 468. Por lo tanto, el experto en la materia es consciente de la naturaleza de este ensayo y sabe cómo aplicarlo.

5 Para la detección y/o caracterización de dichos anticuerpos, el aptámero de la invención puede usarse en solución o en una forma inmovilizada.

El aptámero de la invención puede usarse para detección directa o indirecta y/o caracterización de dichos anticuerpos.

10 De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona un procedimiento para la preparación de un oligonucleótido de aptámero que comprende las etapas de determinación de una secuencia de nucleótidos para uso como una secuencia de aptámero que comprende la aplicación del siguiente conjunto de normas de producción P:

$$P = \{$$

S	→	M   Y   D   E   H	(1)
M	→	NRM	(2)
M	→	MR	(3)
M	→	RM	(4)
N	→	M	(5)
D	→	YM	(6)
E	→	VM	(6a)
Y	→	K   KL   LK   LKL	(7)
H	→	LV   V	(8)
R	→	L	(9)
Z	→	A   C   G   T	(10)
L	→	ZL   Z	(11)
BX	→	G <sup>x</sup>	(12)
CX	→	BXLBX	(13)
M	→	CXLCX	(14)
K	→	CXLBX	(15)
V	→	CXL	(16)

$$\}$$

con las condiciones de

- a.) Q es el conjunto de números naturales
- b.) F es un subconjunto de número naturales definido como

15 
$$F := \{X \in Q \mid (X > 1)\}$$

c.) Usando F se define:

- (1)  $\forall X \in F \exists M : M \rightarrow CXLCX$
- (2)  $\forall X \in F \exists K : K \rightarrow CXLBX$
- (3)  $\forall X \in F \exists V : V \rightarrow CXL$
- 20 (4)  $\forall X \in F : CX \rightarrow BXLBX$

(5)  $\forall X \in F : BX \rightarrow \prod_1^X G$

d.) U es un conjunto de no terminales definido como

$$U = \{S, M, N, D, E, Y, H, R, Z, L, BX, CX, K, V\}$$

Para BX y CX véase c)

25 e.) W es un conjunto de no terminales definido como

$$W = \{A, C, G, T, G^x\}$$

G<sup>x</sup> indica todos los terminales que pueden obtenerse según b.) y c.) (5)  
 f.) S ∈ U es el símbolo de partida

5 en la que "A" significa un nucleótido de adenina, "C" significa un nucleótido de citosina, "G" significa un nucleótido de guanina y "T" significa un nucleótido de timina si la secuencia de nucleótidos es una secuencia de ADN y "T" significa un nucleótido de uracilo si la secuencia de nucleótidos es una secuencia de ARN, y producir un oligonucleótido de aptámero que tiene la secuencia de nucleótidos obtenida en la primera etapa.

De acuerdo con una realización preferida, la etapa de determinación de una secuencia de nucleótidos para su uso como una secuencia de aptámero comprende la aplicación de la siguiente secuencia consenso

$$S_i-(GGG-S-GGG-S)_n-(GGG-S-GGG)_k-S_m \quad (1)$$

10 en la que

n > 1;  
 i, m, k = 0, 1;  
 S = {A,C,G,T}<sup>+</sup> o {A,C,G}<sup>+</sup> o {A,C,T}<sup>+</sup> o {A,G,T}<sup>+</sup> o {C,G,T}<sup>+</sup> o {A,C}<sup>+</sup> o {A,G}<sup>+</sup> o {A,T}<sup>+</sup> o {C,G}<sup>+</sup> o {C,T}<sup>+</sup> o {G,T}<sup>+</sup> o {A}<sup>+</sup> o {C}<sup>+</sup> o {T}<sup>+</sup>; en la que {}<sup>+</sup> indica el cierre de Kleene positivo del conjunto de alfabeto dado.

15 La expresión cierre de Kleene positivo describe un modo de concatenación de miembros de un conjunto finito, no vacío, de símbolos (un vocabulario o alfabeto). Como resultado de este proceso se crearán nuevas palabras (secuencias de símbolos). Cada palabra tiene una longitud mayor de cero.

20 De acuerdo con otra realización preferida de la presente invención, se proporciona un aptámero que comprende una secuencia de nucleótidos que satisface la secuencia consenso de fórmula (1) para uso en el tratamiento y/o diagnóstico de enfermedades autoinmunitarias asociadas con autoanticuerpos contra receptores acoplados a proteína G, en la que "A" significa un nucleótido de adenina, "C" significa un nucleótido de citosina, "G" significa un nucleótido de guanina y "T" significa un nucleótido de timina si la secuencia de nucleótidos es una secuencia de ADN y "T" significa un nucleótido de uracilo si la secuencia de nucleótidos es una secuencia de ARN, en la que el aptámero no comprende la secuencia de nucleótidos CGCCTAGGTTGGGTAGGGTGGTGGCG (SEQ ID NO: 24).

25 De acuerdo con otra realización preferida más, la etapa de determinación de una secuencia de nucleótidos para su uso como una secuencia de aptámero comprende la aplicación de la siguiente secuencia consenso

$$S_i-(GG-S-GG-S)_n-(GG-S-GG)_k-S_m \quad (2)$$

en la que

30 n > 1;  
 i, m, k = 0, 1;  
 S = {A,C,G,T}<sup>+</sup> o {A,C,G}<sup>+</sup> o {A,C,T}<sup>+</sup> o {A,G,T}<sup>+</sup> o {C,G,T}<sup>+</sup> o {A,C}<sup>+</sup> o {A,G}<sup>+</sup> o {A,T}<sup>+</sup> o {C,G}<sup>+</sup> o {C,T}<sup>+</sup> o {G,T}<sup>+</sup> o {A}<sup>+</sup> o {C}<sup>+</sup> o {T}<sup>+</sup>;  
 en la que {}<sup>+</sup> indica el cierre de Kleene positivo del conjunto de alfabeto dado.

35 De acuerdo con otra realización preferida de la presente invención, se proporciona un aptámero que comprende una secuencia de nucleótidos que satisface la secuencia consenso de fórmula (2) para su uso en el tratamiento y/o diagnóstico de enfermedades autoinmunitarias asociadas con autoanticuerpos contra receptores acoplados a proteína G, en la que "A" significa un nucleótido de adenina, "C" significa un nucleótido de citosina, "G" significa un nucleótido de guanina y "T" significa un nucleótido de timina si la secuencia de nucleótidos es una secuencia de ADN y "T" significa un nucleótido de uracilo si la secuencia de nucleótidos es una secuencia de ARN, en la que el aptámero no comprende la secuencia de nucleótidos GGTTGGTGTGGTTGG (SEQ ID NO: 22), GGTTGGTGTGGT (SEQ ID NO: 23) o CGCCTAGGTTGGGTAGGGTGGTGGCG (SEQ ID NO: 24).

40 De acuerdo con otra realización preferida, la etapa de determinación de una secuencia de nucleótidos para su uso como una secuencia de aptámero comprende la aplicación de la siguiente secuencia consenso

$$S_i-P-(LM)_j-E_k; \quad (3)$$

45 en la que

i, k = 0, 1;  
 j >= 0;  
 P = (G<sub>m</sub>-(X)-G<sub>m</sub>-(Y)-G<sub>m</sub>-(Z)-G<sub>m</sub>);  
 M = (G<sub>m</sub>-(X)-G<sub>m</sub>-(Y)-G<sub>m</sub>-(Z)-G<sub>m</sub>);  
 50 m > 1;  
 S,L,E,X,Y,Z = {A,C,G,T}<sup>+</sup> o {A,C,G}<sup>+</sup> o {A,C,T}<sup>+</sup> o {A,G,T}<sup>+</sup> o {C,G,T}<sup>+</sup> o {A,C}<sup>+</sup> o {A,G}<sup>+</sup> o {A,T}<sup>+</sup> o {C,G}<sup>+</sup> o {C,T}<sup>+</sup> o {G,T}<sup>+</sup> o {A}<sup>+</sup> o {C}<sup>+</sup> o {T}<sup>+</sup> en la que {}<sup>+</sup> indica el cierre de Kleene positivo del conjunto de alfabeto dado.

De acuerdo con otra realización preferida de la presente invención, se proporciona un aptámero que comprende una secuencia de nucleótidos que satisface la secuencia consenso de fórmula (3) para su uso en el tratamiento y/o diagnóstico de enfermedades autoinmunitarias asociadas con autoanticuerpos contra receptores acoplados a proteína G, en la que "A" significa un nucleótido de adenina, "C" significa un nucleótido de citosina, "G" significa un nucleótido de guanina y "T" significa un nucleótido de timina si la secuencia de nucleótidos es una secuencia de ADN y "T" significa un nucleótido de uracilo si la secuencia de nucleótidos es una secuencia de ARN, en la que el aptámero no comprende la secuencia de nucleótidos GGTTGGTGTGGTTGG (SEQ ID NO: 22), GGTTGGTGTGGT (SEQ ID NO: 23) o CGCCTAGGTTGGGTAGGGTGGTGGCG (SEQ ID NO: 24).

De acuerdo con otra realización preferida más, la etapa de determinación de una secuencia de nucleótidos para su uso como una secuencia de aptámero comprende la aplicación de la siguiente secuencia consenso

$$S_i-P-E_j; \quad (4)$$

en la que

$$i, j = 0, 1;$$

$$P = (G_m-(X)-G_m-(Y)-G_m);$$

$$m > 1;$$

X, Y, S, E = {A, C, G, T}<sup>+</sup> o {A, C, G}<sup>+</sup> o {A, C, T}<sup>+</sup> o {A, G, T}<sup>+</sup> o {C, G, T}<sup>+</sup> o {A, C}<sup>+</sup> o {A, G}<sup>+</sup> o {A, T}<sup>+</sup> o {C, G}<sup>+</sup> o {C, T}<sup>+</sup> o {G, T}<sup>+</sup> o {A}<sup>+</sup> o {C}<sup>+</sup> o {T}<sup>+</sup> en la que {}<sup>+</sup> indica el cierre de Kleene positivo del conjunto de alfabeto dado.

De acuerdo con otra realización preferida de la presente invención, se proporciona un aptámero que comprende una secuencia de nucleótidos que satisface la secuencia consenso de fórmula (4) para su uso en el tratamiento y/o diagnóstico de enfermedades autoinmunitarias asociadas con autoanticuerpos contra receptores acoplados a proteína G, en la que "A" significa un nucleótido de adenina, "C" significa un nucleótido de citosina, "G" significa un nucleótido de guanina y "T" significa un nucleótido de timina si la secuencia de nucleótidos es una secuencia de ADN y "T" significa un nucleótido de uracilo si la secuencia de nucleótidos es una secuencia de ARN, en la que el aptámero no comprende la secuencia de nucleótidos GGTTGGTGTGGTTGG (SEQ ID NO: 22), GGTTGGTGTGGT (SEQ ID NO: 23) o CGCCTAGGTTGGGTAGGGTGGTGGCG (SEQ ID NO: 24).

Usando el procedimiento de la presente invención, es posible determinar secuencias de nucleótidos que tienen los patrones estructurales que son necesarios y suficientes para ser eficaces como aptámeros terapéuticos y/o de diagnóstico para su uso en el tratamiento y/o diagnóstico de enfermedades autoinmunitarias asociadas con autoanticuerpos contra receptores acoplados a proteína G.

Pueden generarse secuencias de aptámeros de la presente invención mediante el uso del procedimiento de acuerdo con la presente invención. A continuación, se muestra como ejemplo la derivación de la secuencia de SEQ ID NO: 12 de acuerdo con la presente invención:

**Derivación de secuencia n.º 12: (5'-GGTGGTGGTGGTTGTGGTGGTGGTGG-3')**

- X = 2
- S → M
- NRM
- MRM
- C2LC2RM
- C2LC2RC2LC2
- B2LB2LC2RC2LC2
- B2LB2LB2LB2RC2LC2
- B2LB2LB2LB2RB2LB2LC2
- B2LB2LB2LB2RB2LB2LB2
- GGLB2LB2LB2RB2LB2LB2
- GGLGGLB2LB2RB2LB2LB2
- GGLGGLGGLB2RB2LB2LB2
- GGLGGLGGLGGRB2LB2LB2
- GGLGGLGGLGGRGGLB2LB2
- GGLGGLGGLGGRGGLGGLB2
- GGLGGLGGLGGRGGLGGLGGLB2
- GGLGGLGGLGGRGGLGGLGGLG
- GGZGGLGGLGGRGGLGGLGGLG
- GGTGGLGGLGGRGGLGGLGGLG

- GGTGGZGGLGGRGGLGGLGGLGG
- GGTGGTGGGGRGGLGGLGGLGG
- GGTGGTGGZGGRGGLGGLGGLGG
- GGTGGTGGTGGRGGLGGLGGLGG
- GGTGGTGGTGGGGLGGLGGLGG
- GGTGGTGGTGGZLGGGGLGGLGG
- GGTGGTGGTGGZZGGLGGLGGLGG
- GGTGGTGGTGGTZGGLGGLGGLGG
- GGTGGTGGTGGTTGGLGGLGGLGG
- GGTGGTGGTGGTTGGZGGLGGLGG
- GGTGGTGGTGGTTGGTGGGGLGG
- GGTGGTGGTGGTTGGTGGTGLGG
- GGTGGTGGTGGTTGGTGGTGGZGG
- **GGTGGTGGTGGTTGGTGGTGGTGG**

**SEQ ID NO: 12**

Usando un analizador sintáctico por desplazamiento y reducción se puede reconocer también la secuencia de SEQ ID NO: 12 en un grupo de secuencias aleatorias como una secuencia válida después de aplicar las normas de la gramática enumeradas en la siguiente tabla. Ya que la secuencia introducida puede reducirse al símbolo de partida S la secuencia es una frase válida para la gramática definida.

Secuencia	Acción	Apilado	Norma
<b>GGTGGTGGTGGTTGGTGGTGGTGG</b>	inicio	\$	
<b>GGTGGTGGTGGTTGGTGGTGGTGG</b>	desplazamiento	GG	
<b>GGTGGTGGTGGTTGGTGGTGGT</b>	reducción	B2	12a
<b>GGTGGTGGTGGTTGGTGGTGGT</b>	desplazamiento	TB2	
<b>GGTGGTGGTGGTTGGTGGTGG</b>	reducción	ZB2	10
<b>GGTGGTGGTGGTTGGTGGTGG</b>	reducción	LB2	11
<b>GGTGGTGGTGGTTGGTGGTGG</b>	desplazamiento	GGLB2	
<b>GGTGGTGGTGGTTGGTGGT</b>	reducción	B2LB2	12a
<b>GGTGGTGGTGGTTGGTGGT</b>	reducción	C2	13a
<b>GGTGGTGGTGGTTGGTGGT</b>	desplazamiento	TC2	
<b>GGTGGTGGTGGTTGGTGG</b>	reducción	ZC2	10
<b>GGTGGTGGTGGTTGGTGG</b>	reducción	LC2	11
<b>GGTGGTGGTGGTTGGTGG</b>	desplazamiento	GGLC2	
<b>GGTGGTGGTGGTTGGT</b>	reducción	B2LC2	12a
<b>GGTGGTGGTGGTTGGT</b>	desplazamiento	TB2LC2	
<b>GGTGGTGGTGGTTGG</b>	reducción	ZB2LC2	10
<b>GGTGGTGGTGGTTGG</b>	reducción	LB2LC2	11
<b>GGTGGTGGTGGTTGG</b>	desplazamiento	GGLB2LC2	
<b>GGTGGTGGTGGTT</b>	reducción	B2LB2LC2	12a
<b>GGTGGTGGTGGTT</b>	reducción	C2LC2	13a
<b>GGTGGTGGTGGTT</b>	reducción	M	14a
<b>GGTGGTGGTGGTT</b>	desplazamiento	TM	
<b>GGTGGTGGTGGT</b>	reducción	ZM	10
<b>GGTGGTGGTGGT</b>	reducción	LM	11
<b>GGTGGTGGTGGT</b>	desplazamiento	TLM	
<b>GGTGGTGGTGG</b>	reducción	ZLM	11
<b>GGTGGTGGTGG</b>	reducción	LM	11
<b>GGTGGTGGTGG</b>	Reducción	RM	9
<b>GGTGGTGGTGG</b>	desplazamiento	GGRM	
<b>GGTGGTGGT</b>	reducción	B2RM	12a

(continuación)

Secuencia	Acción	Apilado	Norma
GGTGGTGGT	desplazamiento	TB2RM	
GGTGGTGG	reducción	ZB2RM	11
GGTGGTGG	reducción	LB2RM	11
GGTGGTGG	desplazamiento	GGLB2RM	
GGTGGT	reducción	B2LB2RM	12a
GGTGGT	reducción	C2RM	13a
GGTGGT	desplazamiento	TC2RM	
GGTGG	reducción	ZC2RM	11
GGTGG	reducción	LC2RM	11
GGTGG	desplazamiento	GGLC2RM	
GGT	reducción	B2LC2RM	12a
GGT	desplazamiento	TB2LC2RM	
GG	reducción	ZB2LC2RM	11
GG	reducción	LB2LC2RM	11
GG	desplazamiento	GGLB2LC2RM	
\$	reducción	B2LB2LC2RM	12
\$	reducción	C2LC2RM	13a
\$	reducción	MRM	14a
\$	reducción	NRM	5
\$	reducción	M	2
\$	reducción	S	1
\$	aceptado		

Se muestra a continuación un ejemplo adicional de derivación de las secuencias de aptámero reivindicadas de SEQ ID NO: 3, 10 y 15 de acuerdo con la presente invención:

5 **Derivación de la secuencia n.º 3: (5'-GGTTGGGGTGGGTGGGGTGGGTGGG-3')**

- X: 3
- S → M
- RM
- LM
- LC3LC3
- ZLC3LC3
- ZZLC3LC3
- ZZZLC3LC3
- ZZZZLC3LC3
- ZZZZLC3LC3
- ZZZZZLC3LC3
- ZZZZZZLC3LC3
- ZZZZZZZLC3LC3
- ZZZZZZZZLC3LC3
- GZZZZZZZC3LC3
- GGZZZZZZC3LC3
- GGTZZZZZC3LC3
- GGTTZZZZC3LC3
- GGTTGZZZC3LC3
- GGTTGGZZC3LC3
- GGTTGGGZC3LC3
- GGTTGGGGZC3LC3

- GGTTGGGGTB3LB3LC3
- GGTTGGGGTB3LB3LB3
- GGTTGGGGTGGGLB3LB3LB3

- GGTTGGGGTGGGZB3LB3LB3
- GGTTGGGGTGGGTB3LB3LB3
- GGTTGGGGTGGGTGGGLB3LB3
- GGTTGGGGTGGGTGGGZLB3LB3
- GGTTGGGGTGGGTGGGZB3LB3
- GGTTGGGGTGGGTGGGGZB3LB3
- GGTTGGGGTGGGTGGGGTB3LB3
- GGTTGGGGTGGGTGGGGTGGGLB3
- GGTTGGGGTGGGTGGGGTGGGZB3
- GGTTGGGGTGGGTGGGGTGGGTB3
- **GGTTGGGGTGGGTGGGGTGGGTGGG**

**SEQ ID NO: 3**

**Derivación de secuencia n.º 10: (5'-GGTGGTGGTGG-3')**

- X = 2
- s → M
- C2LC2
- B2LB2LC2
- GGLB2LC2
- GGZB2LC2
- GGTB2LC2
- GGTGGLC2
- GGTGGZC2
- GGTGGTC2
- GGTGGTB2LB2
- GGTGGTGLB 2
- GGTGGTGGZB2
- GGTGGTGGTB2
- **GGTGGTGGTGG**

**SEQ ID NO: 10**

**5 Derivación de secuencia n.º 15: (5'-TTTGGTGGTGGTGGTTGTGGTGGTGGTTT-3')**

- X= 2
- s→M
- RM
- RNRM
- RNRMR
- RMRMR
- LMRMR
- ZLMRMR
- ZZLMRMR
- ZZZMRMR
- TZZMRMR
- TTZMRMR
- TTTMRMR
- TTTC2LC2RMR
- TTTB2LB2LC2RMR
- TTTGGLB2LC2RMR
- TTTGGLB2LC2RMR
- TTTGGZB2LC2RMR
- TTTGGTB2LC2RMR
- TTTGGTGGC2RMR



→TTTGGTGGZC2RMR  
 →TTTGGTGGTC2RMR  
 →TTTGGTGGTB2LB2RMR  
 →TTTGGTGGTGLB2RMR  
 →TTTGGTGGTGGZB2RMR  
 →TTTGGTGGTGGTB2RMR  
 →TTTGGTGGTGGTGGRMR  
 →TTTGGTGGTGGTGGLMR  
 →TTTGGTGGTGGTGGZLMR  
 →TTTGGTGGTGGTGGZZLMR  
 →TTTGGTGGTGGTGGZZZMR  
 →TTTGGTGGTGGTGGTZZMR  
 →TTTGGTGGTGGTGGTTZZMR  
 →TTTGGTGGTGGTGGTTGZMR  
 →TTTGGTGGTGGTGGTTGTMR  
 →TTTGGTGGTGGTGGTTGTC2LC2R  
 →TTTGGTGGTGGTGGTTGTB2LB2LC2R  
 →TTTGGTGGTGGTGGTTGTGGLB2LC2R  
 →TTTGGTGGTGGTGGTTGTGGZB2LC2R  
 →TTTGGTGGTGGTGGTTGTGGTB2LC2R  
 →TTTGGTGGTGGTGGTTGTGGTGLC2R  
 →TTTGGTGGTGGTGGTTGTGGTGGZC2R  
 →TTTGGTGGTGGTGGTTGTGGTGGTC2R  
 →TTTGGTGGTGGTGGTTGTGGTGGTB2LB2R  
 →TTTGGTGGTGGTGGTTGTGGTGGTGLB2R  
 →TTTGGTGGTGGTGGTTGTGGTGGTGGZB2R  
 →TTTGGTGGTGGTGGTTGTGGTGGTGGTB2R  
 →TTTGGTGGTGGTGGTTGTGGTGGTGGTGGR  
 →TTTGGTGGTGGTGGTTGTGGTGGTGGTGL  
 →TTTGGTGGTGGTGGTTGTGGTGGTGGTGGZL  
 →TTTGGTGGTGGTGGTTGTGGTGGTGGTGGZZL  
 →TTTGGTGGTGGTGGTTGTGGTGGTGGTGGZZZ  
 →TTTGGTGGTGGTGGTTGTGGTGGTGGTGGTZZ  
 →TTTGGTGGTGGTGGTTGTGGTGGTGGTGGTTZ  
 →**TTTGGTGGTGGTGGTTGTGGTGGTGGTGGTTT**

SEQ ID NO: 15

Todas las realizaciones de la presente invención como se describen en el presente documento se consideran combinables en cualquier combinación, a no ser que el experto en la materia considere que dicha combinación no tiene sentido técnico.

## 5 Ejemplos

Ensayo funcional para la estimación de actividad de autoanticuerpo (autoanticuerpos contra receptores acoplados a proteína G, AAB)

Se aprovechó un ensayo funcional capaz de identificar y cuantificar autoanticuerpos contra receptores acoplados a proteína G (AAB) para la estimación de la capacidad de neutralización de AAB de los aptámeros de la presente invención.

Este ensayo funcional aprovechó cardiomiocitos de rata con latido espontáneo que fueron capaces de responder a AAB de pacientes, cuando se añadieron alícuotas de fracción de IgG purificada, con un cambio en su frecuencia de latido, la respuesta cronotrópica. La respuesta cronotrópica es la suma de cronotropía positiva o cronotropía negativa provocada por estimulación de AAB tales como los que se dirigen a receptores beta1, beta2 o alfa1 adrenérgicos, receptores muscarínicos M2 y el receptor de endotelina de tipo A (receptor de ETA) y se expresa como la diferencia con respecto a la frecuencia de latido basal, latido delta/tiempo.

La inhibición de AAB tales como el AAB de adrenorreceptor beta2 hallado en pacientes con asma alérgica, antagoniza el efecto cronotrópico positivo inducido por agonistas beta2 adrenérgicos.

Para diferenciar las especies de AAB con respecto a su contribución a la respuesta cronotrópica (cronotropía positiva o negativa), se realizó el análisis en presencia de antagonistas específicos tales como ICI-118.551 para beta2-AAB, atropina para M2-AAB, propranolol para beta1/beta2-AAB, BQ 610 o BQ 123 para el receptor de ETA, prazosina o urapidilo para el adrenorreceptor alfa1 e lbesartán o Losartán para el receptor de AT1. El cambio de actividad restante está provocado por AAB excepto los que se bloquearon específicamente.

Además la especificidad del AAB se analizó en más detalle usando péptidos de los receptores acoplados a proteína G correspondientes a las estructuras extracelulares de los receptores que pueden neutralizar la actividad de AAB. De una manera similar los aptámeros se ensayaron con respecto a su capacidad neutralizante de AAB.

- 5 Este ensayo funcional puede detectar y cuantificar todos los AAB en suero humano y otras moléculas que se dirigen a receptores en la superficie celular cuyas secuencias son homólogas de los receptores humanos (un prerrequisito para la dirección de AAB) y que están ligadas a una cascada de proteínas que regula la frecuencia de latido (contractilidad, cronotropía) de las células tales como el sistema de proteína G.

#### Preparación de cardiomiocitos neonatales

- 10 Para la preparación de cardiomiocitos neonatales, se retiraron corazones de ratas de 1 a 3 días de edad en condiciones estériles y se transfirieron a solución salina tamponada con fosfato (PBS) contenía penicilina/estreptomina. Después de la separación del tejido ventricular, se diseccionó en trozos y se lavó dos veces con 10 ml de PBS. A continuación, los trozos de ventrículo diseccionados se suspendieron en 30 ml de PBS/tripsina 0,2 % y se incubaron durante 15 minutos a 37 °C. El proceso de tripsinación se detuvo añadiendo 5 ml de suero de ternero neonatal inactivado por calor helado. La suspensión resultante se centrifugó (130 x g, 15 minutos) y el sedimento se transfirió a 20 ml de medio SM20-I. Las tablas se contaron diluyendo al mismo tiempo una alícuota de la suspensión resultante con el mismo volumen de una solución de azul de tripano.

- 15 Se transfirieron  $2,4 \times 10^6$  células suspendidas en 2,0 ml de medio SM20-I que contenía glucosa que se equilibró con aire húmedo y se complementó con suero de ternero neonatal inactivado por calor al 10 %, fluorodesoxuridina  $2 \mu\text{m}$  a matraces Falcon de  $12,5 \text{ cm}^2$  para cultivar como monocapas durante 4 días a 37 °C. El medio se renovó el primer día y a continuación cada dos días. Los experimentos se procesaron en los matraces.

#### Preparación de muestras de suero para medición de AAB

Para la preparación de la fracción de IgG, adecuada para la medición de AAB, se mezclaron 1 ml de suero y 660  $\mu\text{l}$  de solución de sulfato de amonio saturada (concentración final de sulfato de amonio 40 %), se incubaron durante 18 horas a 4 °C y se centrifugaron durante 15 minutos a 6.000 x g.

- 25 El sedimento se resuspendió en 750  $\mu\text{l}$  de PBS, se mezcló con 750  $\mu\text{l}$  de solución de sulfato de amonio saturada (concentración final de sulfato de amonio al 50 %) y se centrifugó de nuevo. El sedimento se suspendió en 700  $\mu\text{l}$  de PBS y se dializó frente al volumen de 100 veces de PBS. La fracción de IgG resultante contenía los AAB y se almacenó a -20 °C hasta su medición.

#### Principio de medición de AAB y preparación de ensayo de aptámeros

- 30 Los experimentos se procesaron en matraces Falcon de  $12,5 \text{ cm}^2$ . Se marcaron 6 grupos celulares independientes que se usaron para la medición y se registraron las trazas de latido de cardiomiocitos basales en las zonas marcadas.

- 35 Para la medición de la actividad de AAB, se añadieron muestras de IgG preparadas a las células en una dilución final como se indica en la figura (por ejemplo, AAB 1:50 que corresponde a 40  $\mu\text{l}$  de la solución de IgG preparada como se ha descrito anteriormente en 2000  $\mu\text{l}$  de medio de cultivo celular). Después de la adición de las muestras de IgG los matraces se incubaron durante 60 minutos a 37 °C y las tasas de latido de los cardiomiocitos en las zonas marcadas se contaron de nuevo y se calculó que las diferencias con respecto a las tasas de latido basales eran positivas o negativas para actividad de AAB cronotrópica positiva o cronotrópica negativa, respectivamente.

- 40 Ensayando el efecto de aptámero, las muestras de IgG que contenían AAB se preincubaron con el aptámero correspondiente (SEQ ID NO: como se indica en la figura) durante 15 minutos antes de añadirse la mezcla a los cardiomiocitos. Después de un tiempo de incubación de 60 minutos (37 °C) se estimó la frecuencia de latido y se calculó la diferencia con respecto a la tasa de latido basal.

La adición de 2  $\mu\text{l}$  de aptámero correspondió a la adición de aptámero 100 nM en el matraz celular final (volumen total de 2000  $\mu\text{l}$ ).

#### 45 **Ejemplo 1:**

La actividad de AAB de adrenergico alfa-1 se supervisó mediante el registro del aumento de la tasa de latido de cardiomiocitos neonatales (véase Figura 1, columna 1: AAB 1:50). Columna 2-5 y 7 de la Figura 1 muestran actividad de AAB reducida después de preincubación de AAB con aptámero 100 nM de la secuencia respectiva (SEQ ID NO: 2, 3, 10, 15 y 20, respectivamente).

- 50 Los resultados de la columna 6 de la Figura 1 se obtuvieron usando 100 nM de una secuencia de aptámero de control (SEQ ID NO: 19: TCGAGAAAACTCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCA) que no es una secuencia aptámero de acuerdo con la presente invención.

**Ejemplo 2:**

La actividad de AAB de adrenergico beta-1 se supervisó mediante el registro del aumento de la tasa de latido de cardiomiocitos neonatales (véase Figura 2, columna 1: AAB 1:50). La columna 2-5 y 7 de la Figura 2 muestran actividad de AAB reducida después de preincubación de AAB con aptámero 100 nM de la secuencia respectiva (SEQ ID NO: 2, 3, 10, 15, y 20, respectivamente). Los resultados de la columna 6 de la Figura 2 se obtuvieron usando 100 nM de una secuencia de aptámero de control (SEQ ID NO: 19) que no es una secuencia de aptámero de acuerdo con la presente invención.

**Ejemplo 3:**

La actividad de AAB de receptor PAR1/PAR2 se supervisó mediante el registro del aumento de la tasa de latido de cardiomiocitos neonatales (véase Figura 3, columna 1: AAB 1:50). La columna 2-5 y 7 de la Figura 3 muestran actividad de AAB reducida después de preincubación de AAB con aptámero 100 nM de la secuencia respectiva (SEQ ID NO: 2, 3, 10, 15 y 20, respectivamente). Los resultados de la columna 6 de la Figura 3 se obtuvieron usando 100 nM de una secuencia de aptámero de control (SEQ ID NO: 19) que no es una secuencia de aptámero de acuerdo con la presente invención.

**Ejemplo 4:**

La actividad de AAB de receptor de endotelina 1 ETA se supervisó mediante el registro de la reducción de la tasa de latido de cardiomiocitos neonatales (véase Figura 3, columna 1: AAB 1:50). La columna 2-5 y 7 de la Figura 3 muestran actividad de AAB reducida después de preincubación de AAB con aptámero 100 nM de la secuencia respectiva (SEQ ID NO: 2, 3, 10, 15 y 20, respectivamente). Los resultados de la columna 6 de la Figura 4 se obtuvieron usando 100 nM de una secuencia de aptámero de control (SEQ ID NO: 19) que no es una secuencia de aptámero de acuerdo con la presente invención.

**Ejemplo 5:**

La influencia dependiente de la concentración de los aptámeros de SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 20 en AAB de adrenergico  $\beta$ 1 se supervisó mediante registro del aumento de la tasa de latido de cardiomiocitos neonatales (punto de datos "sin" en la etiqueta del eje x corresponde a: AAB 1:50). Las curvas visualizan la dependencia de dosis del efecto del aptámero de aptámero SEQ ID NO: 10 y 20. La curva obtenida usando SEQ ID NO: 19 sirvió para el control ya que SEQ ID NO: 19 no es una secuencia de aptámero de acuerdo con la presente invención.

**Ejemplo 6:**

En el ejemplo 6, se muestran los efectos por sí mismos de los aptámeros de la invención (SEQ ID NO: 2, 3, 10, 15, 20 y 12 mostradas en las columnas 1, 2, 3, 4, 6 y 7, respectivamente) en la tasa de latido basal de cardiomiocitos. Los resultados de la columna 5 de la Figura 6 se obtuvieron usando una secuencia de aptámero de control (SEQ ID NO: 19) que no es una secuencia de aptámero de acuerdo con la presente invención.

**Ejemplo 7:**

La actividad de AAB se supervisó mediante el registro del aumento de la tasa de latido de cardiomiocitos neonatales (véase Figura 7, columna 1:  $\beta$ 1-AAB N.º 1, 1:50, columna 3:  $\beta$ 1-AAB N.º 2, 1:50, columna 5:  $\beta$ 1-AAB N.º 3, 1:50, columna 7: alfa1-AAB N.º 1, 1:50, columna 8: alfa1-AAB N.º 2, 1:50, columna 11:  $\beta$ 2-AAB N.º 1, 1:50, columna 13:  $\beta$ 2-AAB N.º 2, 1:50). Las columnas 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 de la Figura 7 muestran actividad de AAB reducida ( $\beta$ 1 AAB1,  $\beta$ 1 AAB2,  $\beta$ 1 AAB 3, alfa 1 AAB1, alfa1 AAB 2,  $\beta$ 2-AAB 1,  $\beta$ 2-AAB 2) a 100 nM de aptámero de SEQ ID NO: 12. AAB N.º 1, 2 y 3 significa AAB preparado a partir de material de paciente diferente.

**Ejemplo 8:**

El ejemplo 8 se llevó a cabo como en el ejemplo 2 anterior. La actividad de AAB de adrenergico beta-1 se supervisó registrando el aumento de la tasa de latido de cardiomiocitos neonatales sin la adición de aptámero (véase Figura 8, columna 1: AAB 1:50) y tras la adición de aptámeros de acuerdo con la invención. Todas las muestras tratadas con aptámero de la invención muestran actividad de AAB reducida después de preincubación de AAB con aptámero 100 nM, 400 nM o 1000 nM de la secuencia respectiva (SEQ ID NO: 1, 4 a 7 a 9, 11 a 14 y 16 a 18 en la Figura 8, respectivamente).

**Ejemplo 9:**

El ejemplo 9 se llevó a cabo como en el ejemplo 2 anterior. La actividad de AAB de adrenergico beta-1 se supervisó registrando el aumento de la tasa de latido de cardiomiocitos neonatales sin la adición del aptámero (véase Figura 10, columna 1: AAB 1:50) y tras la adición de aptámeros de acuerdo con la invención. Todas las muestras tratadas con aptámero de la invención muestran actividad de AAB reducida después de preincubación de AAB con aptámero 100 nM de la secuencia respectiva (SEQ ID NO: 25 a 45 en la Figura 8, respectivamente; para identidades mutuas de estas secuencias, véase Figura 9). Los experimentos con aptámeros de las secuencias SEQ ID NO: 31 a 34, 44 y 45 se han repetido adicionalmente usando 400 nM de cada aptámero (véase posteriormente en

el ejemplo 10).

**Ejemplo 10:**

5 El ejemplo 10 se llevó a cabo como en el Ejemplo 2 anterior. La actividad de AAB de adrenorreceptor beta-1 se supervisó registrando el aumento de la tasa de latido de cardiomiocitos neonatales sin la adición del aptámero (véase Figura 11, columna 1: AAB 1:50) y tras la adición de aptámeros de acuerdo con la invención. Todas las muestras tratadas con aptámero de la invención muestran actividad de AAB reducida después de preincubación de AAB con aptámero 100 nM de la secuencia respectiva (SEQ ID NO: 31 a 34, 44 y 45, respectivamente).

**Ejemplo 11:**

10 El ejemplo 11 se llevó a cabo como en el Ejemplo 2 anterior. La actividad de AAB de adrenorreceptor beta-1 se supervisó registrando el aumento de la tasa de latido de cardiomiocitos neonatales sin la adición de aptámero (véase Figura 12, columna 1: AAB 1:50) y tras la adición de secuencias de control no de acuerdo con la invención. Todas las muestras tratadas con las secuencias de control muestran actividad de AAB no afectada después de preincubación de AAB con control 100 nM, 400 nM o 1000 nM de la secuencia respectiva (SEQ ID NO 46: 5'-ACCTCTCCTTCTCCTCTCCTCTCAAAAAGAGCT-3', SEQ ID NO 47: 5'-TCCCATCTATTATTTTCTTCTAATCATC-3', SEQ ID NO 48: 5'-ATCTCATGAACGTAAGCCATTCAAACG-3', SEQ ID NO 49: 5'-ACACTAGTAGCCACACTGAG-3', SEQ ID NO 50: 5'-CCTGCCCCCTAAA-3', respectivamente).

**Ejemplo 12:**

20 El ejemplo 12 se llevó a cabo como en el ejemplo 2 anterior. La actividad de AAB de adrenorreceptor beta-1 aislados de pacientes que padecen depresión o miocardiopatías de Chagas (de izquierda a derecha en la Figura 13) se supervisó registrando el aumento de la tasa de latido de cardiomiocitos neonatales sin adición de aptámero (véase Figura 13, columna 1: AAB 1:50) y tras la adición de 100 nM de aptámero de SEQ ID NO 12 de acuerdo con la invención. Las muestras tratadas con aptámero de la invención muestran actividad de AAB reducida después de preincubación de AAB con 100 nM de SEQ ID NO: 12 en comparación con la muestra de control a la que no se ha añadido aptámero.

25 **Ejemplo 13:**

El ejemplo 13 se llevó a cabo como en el ejemplo 12 anterior, en el que en este ejemplo se supervisó la actividad de AAB de adrenorreceptor beta-2 aislados de pacientes que padecen glaucoma, esquizofrenia, miocardiopatía de Chagas, síndrome urémico hemolítico (EHEC) o enfermedad de Alzheimer (de izquierda a derecha en la Figura 14) en ausencia o presencia de 100 nM del aptámero de la invención de SEQ ID NO: 12.

30 **Ejemplo 14:**

El ejemplo 14 se llevó a cabo como en el ejemplo 12 anterior, en el que en este ejemplo se supervisó la actividad de AAB de AT1 aislados de pacientes que padecen alopecia, rechazo de aloinjerto de riñón o alta presión sanguínea en enfermedad renal (de izquierda a derecha en la Figura 15) y en ausencia o presencia de 100 nM del aptámero de la invención de SEQ ID NO: 12.

35 **Ejemplo 15:**

El ejemplo 15 se llevó a cabo como en el ejemplo 12 anterior, en el que en este ejemplo se supervisó la actividad de AAB de ETA aislados de pacientes que padecen hipertensión arterial pulmonar, enfermedad de Raynaud, angina de pecho o alta tensión arterial en enfermedad renal (de izquierda a derecha en la Figura 16) en ausencia o presencia de 100 nM del aptámero de la invención de SEQ ID NO: 12.

40 **Ejemplo 16:**

45 El ejemplo 16 se llevó a cabo como en el ejemplo 12 anterior, en el que en este ejemplo se supervisó la actividad de AAB de alfa 1 aislados de pacientes que padecen hipertensión arterial pulmonar, quimioterapia, esclerosis múltiple, alopecia, alopecia areata, síndrome urémico hemolítico (EHEC), síndrome de Sjögren, enfermedad de Alzheimer, neurodermatitis, diabetes mellitus de tipo 1 o psoriasis (de izquierda a derecha en la Figura 17) en ausencia o presencia de 100 nM del aptámero de la invención de SEQ ID NO: 12.

**Ejemplo 17:**

50 El ejemplo 17 se llevó a cabo como en el ejemplo 12 anterior, en el que en este ejemplo se supervisó la actividad de AAB de PAR aislados de pacientes que padecen enfermedad de Raynaud, angina de pecho o síndrome de Sjögren (de izquierda a derecha en la Figura 18) en ausencia o presencia de 100 nM del aptámero de la invención de SEQ ID NO: 12.

**Ejemplo 18:**

5 El ejemplo 18 se llevó a cabo como en el ejemplo 12 anterior, en el que en este ejemplo se supervisó la actividad de AAB de MAS aislados de pacientes que padecen quimioterapia, esclerosis múltiple o diabetes mellitus de tipo 1 (de izquierda a derecha en la Figura 19) en ausencia o presencia de 100 nM del aptámero de la invención de SEQ ID NO: 12.

**Ejemplo 19:**

10 El ejemplo 19 se llevó a cabo como en el ejemplo 12 anterior, en el que en este ejemplo se supervisó la actividad de AAB de 5HT4 aislados de pacientes que padecen depresión, esquizofrenia o migraña/enfermedad de Parkinson (de izquierda a derecha en la Figura 20) en ausencia o presencia de 100 nM del aptámero de la invención de SEQ ID NO: 12.

**Ejemplo 20:**

15 El ejemplo 20 se llevó a cabo como en el ejemplo 12 anterior, en el que en este ejemplo se supervisó la actividad de AAB de M2 aislados de pacientes que padecen miocardiopatía de Chagas, alopecia areata, migraña/enfermedad de Parkinson o síndrome de Sjögren (de izquierda a derecha en la Figura 21) en ausencia o presencia de 100 nM del aptámero de la invención de SEQ ID NO: 12.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 20 <110> Berlin Cures Holding AG
- <120> Aptámeros para su uso contra enfermedades asociadas con autoanticuerpos
- <130> 7161-X-29454WO
- 25 <150> EP14179715.9
- <151> 04-08-2014
- <160> 50
- 30 <170> BiSSAP 1.3
- <210> 1
- <211> 14
- <212> ADN
- 35 <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> secuencia de aptámero
- 40 <400> 1
- gttggttggg gtgg 14
- <210> 2
- <211> 15
- <212> ADN
- 45 <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Secuencia de aptámero
- 50 <400> 2
- gttggttggg gtggt 15
- <210> 3
- <211> 25
- 55 <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 60 <223> Secuencia de aptámero

	<400> 3 ggtggggtg ggtggggtg gtggg	25
5	<210> 4 <211> 28 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Secuencia de aptámero	
	<400> 4 tttgggtggtg gtggttgtg tgggtggtg	28
15	<210> 5 <211> 29 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Secuencia de aptámero <400> 5 tttgggtggtg gtggttgtg tgggtggtg	29
25	<210> 6 <211> 29 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> Secuencia de aptámero	
	<400> 6 tttgggtggtg gtggtttgg tgggtggtg	29
35	<210> 7 <211> 29 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> Secuencia de aptámero	
45	<400> 7 tttgggtggtg gtgggtggtg tgggtggtg	29
50	<210> 8 <211> 29 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> Secuencia de aptámero <400> 8 tttgggtggtg gtggtttggg tgggtggtg	29
60	<210> 9 <211> 13 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
65	<220> <223> Secuencia de aptámero	

	<400> 9 tgggtggtg ggt	13	
5	<210> 10 <211> 11 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
10	<220> <223> Secuencia de aptámero		
	<400> 10 ggtggtggtg g	11	
15	<210> 11 <211> 14 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
20	<220> <223> Secuencia de aptámero		
	<400> 11 ggtggtggtg gttg	14	
25	<210> 12 <211> 26 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
30	<220> <223> Secuencia de aptámero		
	<400> 12 ggtggtggtg gttggtggtg tgggtg	26	
35	<210> 13 <211> 56 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
40	<220> <223> Secuencia de aptámero		
	<400> 13 ggtggtggtg gttggtggtg tgggtggtg gttggtggtg tgggtg	56	
45	<210> 14 <211> 32 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
50	<220> <223> Secuencia de aptámero		
	<400> 14 ggtggtggtg gttggtggtg tgggtggtg gg	32	
55	<210> 15 <211> 32 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
60	<220> <223> Secuencia de aptámero		
65	<220> <223> Secuencia de aptámero		

	<400> 15 tttgggtggtg gtgggtggtg tgggtggtgt tt	32
5	<210> 16 <211> 28 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Secuencia de aptámero	
	<400> 16 ggtgggtggtg tttggtggtg ggtgggtt	28
15	<210> 17 <211> 28 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Secuencia de aptámero	
25	<400> 17 tttgggtggtg gtgggtggtg ggtgggtg	28
30	<210> 18 <211> 10 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Secuencia de aptámero	
35	<400> 18 tgggtggtgt 10	
40	<210> 19 <211> 35 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Secuencia de aptámero	
45	<400> 19 tcgagaaaaa ctctcctctc ctccttct ctcca	35
50	<210> 20 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Secuencia de aptámero	
55	<400> 20 ttagggtag ggttagggtt aggg	24
60	<210> 21 <211> 26 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
65	<220> <223> Secuencia de aptámero	



	<400> 21 gactgtaccg aggtgcaagt actcta	26
5	<210> 22 <211> 15 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Secuencia de aptámero	
15	<400> 22 ggttggtgtg gttgg	15
20	<210> 23 <211> 12 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> Secuencia de aptámero	
30	<400> 23 ggttggtgtg gt	12
35	<210> 24 <211> 26 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> Secuencia de aptámero	
45	<400> 24 cgcctagggt ggtaggggtg gtggcg	26
50	<210> 25 <211> 26 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> Secuencia de aptámero	
60	<400> 25 gcggtggtgg gatgggttg atccgc	26
65	<210> 26 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Secuencia de aptámero	
	<400> 26 gggtcgggat ctagggtcag g	21
	<210> 27 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Secuencia de aptámero	

<400> 27  
 ggtgggtcgg tagggtt 18  
  
 5 <210> 28  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 10 <220>  
 <223> Secuencia de aptámero  
  
 <400> 28  
 ttgctgat cggacgt 18  
  
 15 <210> 29  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 20 <220>  
 <223> Secuencia de aptámero  
  
 <400> 29  
 ggtcgggttc ggtggta 18  
  
 25 <210> 30  
 <211> 29  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 30 <220>  
 <223> Secuencia de aptámero  
  
 <400> 30  
 gggatcggtt cggtaggtgg gtgggttg 29  
  
 35 <210> 31  
 <211> 15  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 40 <220>  
 <223> Secuencia de aptámero  
  
 <400> 31  
 ggccggcgcg gccgg 15  
  
 45 <210> 32  
 <211> 15  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 50 <220>  
 <223> Secuencia de aptámero  
  
 <400> 32  
 ggaaggatcg gaagg 15  
  
 55 <210> 33  
 <211> 15  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 60 <220>  
 <223> Secuencia de aptámero  
  
 65 <220>  
 <223> Secuencia de aptámero

<400> 33  
 ggtaggctcg gtagg 15

5 <210> 34  
 <211> 15  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Secuencia de aptámero

15 <400> 34  
 ggatggtag gatgg 15

20 <210> 35  
 <211> 43  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

25 <220>  
 <223> Secuencia de aptámero

30 <400> 35  
 ccgctgggcc gttcggatt ttttctggg tgctgagga tcg 43

35 <210> 36  
 <211> 43  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <223> Secuencia de aptámero

45 <400> 36  
 gggttggcc gttgggtatt ttttatggg tgcctggtt ggg 43

50 <210> 37  
 <211> 47  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

55 <220>  
 <223> Secuencia de aptámero

60 <400> 37  
 tccatcggg tagggtatt tgggtctgg gtgctgagg atcgatc 47

65 <210> 38  
 <211> 10  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

70 <220>  
 <223> Secuencia de aptámero

75 <400> 38  
 tggcgggtg 10

80 <210> 39  
 <211> 10  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

85 <220>  
 <223> Secuencia de aptámero

	<400> 39 tggaggtgga	10	
5	<210> 40 <211> 10 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
10	<220> <223> Secuencia de aptámero		
15	<400> 40 aggtggtgga	10	
20	<210> 41 <211> 10 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
25	<220> <223> Secuencia de aptámero		
30	<400> 41 aggtggcgga	10	
35	<210> 42 <211> 26 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
40	<220> <223> Secuencia de aptámero		
45	<400> 42 gtggtggtgg tgttgggtgt ggtggg	26	
50	<210> 43 <211> 29 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
55	<220> <223> Secuencia de aptámero		
60	<400> 43 tgggtgggt tgttgtgtt ggggtgggt	29	
65	<210> 44 <211> 41 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
70	<220> <223> Secuencia de aptámero		
75	<400> 44 ggtggtggtg gtggttggtt tttggttgggt ggtggtggtg g	41	
80	<210> 45 <211> 41 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
85	<220> <223> Secuencia de aptámero		

<400> 45  
 ctgggggtgg gtttggttt gtttggtt gggtgggg c 41

5  
 <210> 46  
 <211> 35  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10  
 <220>  
 <223> Secuencia de control

<400> 46  
 acctctctt ccttctctc ctctcaaaa gagct 35

15  
 <210> 47  
 <211> 29  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

20  
 <220>  
 <223> Secuencia de control

<400> 47  
 tccatctat tattttctt ctaatcatc 29

25  
 <210> 48  
 <211> 28  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

30  
 <220>  
 <223> Secuencia de control

<400> 48  
 atctcatgaa cgtaaagcca tcaaacg 28

35  
 <210> 49  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

40  
 <220>  
 <223> Secuencia de control

<400> 49  
 aactagtag ccactgag 20

45  
 <210> 50  
 <211> 13  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

50  
 <220>  
 <223> Secuencia de control

<400> 50  
 cctgcccct aaa 13

55

**REIVINDICACIONES**

1. Aptámero que comprende una secuencia de nucleótidos que satisface una gramática definida por el conjunto de normas de producción P:

$$P = \{$$

S	→	M   Y   D   E   H	(1)
M	→	NRM	(2)
M	→	MR	(3)
M	→	RM	(4)
N	→	M	(5)
D	→	YM	(6)
E	→	VM	(6a)
Y	→	K KL LK LKL	(7)
H	→	LV   V	(8)
R	→	L	(9)
Z	→	A   C   G   T	(10)
L	→	ZL   Z	(11)
BX	→	G <sup>x</sup>	(12)
CX	→	BXLBX	(13)
M	→	CXLCX	(14)
K	→	CXLBX	(15)
V	→	CXL	(16)

$$\}$$

5 con las condiciones de

- a.) Q es el conjunto de números naturales
- b.) F es un subconjunto de números naturales definido como

$$F = \{X \in Q \mid (X > 1)\}$$

c.) Usando F se definen:

- 10
- (1)  $\forall X \in F \exists M : M \rightarrow CXLCX$
  - (2)  $\forall X \in F \exists K : K \rightarrow CXLBX$
  - (3)  $\forall X \in F \exists V : V \rightarrow CXL$
  - (4)  $\forall X \in F : CX \rightarrow BXLBX$

(5)  $\forall X \in F : BX \rightarrow \prod_1^X G$

15 d.) U es un conjunto de no terminales definido como

$$U = \{S, M, N, D, E, Y, H, R, Z, L, BX, CX, K, V\}$$

Para BX y CX véase c)

e.) W es un conjunto de terminales definido como

$$W = \{A, C, G, T, G^x\}$$

- 20 G<sup>x</sup> indica todos los terminales que pueden obtenerse de acuerdo con b.) y c.) (5)  
 f.) S ∈ U es el símbolo de partida

25 para su uso en el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias asociadas con autoanticuerpos contra receptores acoplados a proteína G, en la que “A” significa un nucleótido de adenina, “C” significa un nucleótido de citosina, “G” significa un nucleótido de guanina y “T” significa un nucleótido de timina si la secuencia de nucleótidos es una secuencia de ADN y “T” significa un nucleótido de uracilo si la secuencia de nucleótidos es una secuencia de ARN,

- en el que el aptámero no comprende la secuencia de nucleótidos GGTTGGTGTGGTTGG (SEQ ID NO: 22), GGTTGGTGTGGT (SEQ ID NO: 23) o CGCCTAGTTGGGTAGGGTGGTGGCG (SEQ ID NO: 24), en el que el aptámero es para su uso en el tratamiento de un paciente en el que pueden detectarse anticuerpos contra receptores acoplados a proteína G,
- 5 en el que la secuencia de nucleótidos tiene una longitud de como máximo 593 nucleótidos.
2. Aptámero para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el aptámero se usa para inhibir la interacción de autoanticuerpos específicos para un receptor acoplado a proteína G con sus proteínas diana.
3. Aptámero para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en el que la secuencia de nucleótidos es una secuencia de ADN, o en el que la secuencia de nucleótidos es una secuencia de ARN.
- 10 4. Aptámero para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la secuencia de nucleótidos comprendida en el aptámero es una cualquiera de las siguientes secuencias:
- (5'-GTTGTTTGGGGTGG-3' SEQ ID NO: 1),  
 (5'-GTTGTTTGGGGTGGT-3' SEQ ID NO: 2)  
 (5'-GGTGGGGTGGGTGGGGTGGGTGGG-3' SEQ ID NO: 3),  
 15 (5'-TTTGGTGGTGGTGGTGTGGTGGTGGTGG-3' SEQ ID NO: 4),  
 (5'-TTTGGTGGTGGTGGTGTGGTGGTGGTGG-3' SEQ ID NO: 5),  
 (5'-TTTGGTGGTGGTGGTTTTGGTGGTGGTGG-3' SEQ ID NO: 6),  
 (5'-TTTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGG-3' SEQ ID NO: 7),  
 (5'-TTTGGTGGTGGTGGTTTTGGTGGTGGTGG-3' SEQ ID NO: 8),  
 20 (5'-TGGTGGTGGTGGT-3' SEQ ID NO: 9),  
 (5'-GGTGGTGGTGG-3' SEQ ID NO: 10),  
 (5'-GGTGGTTGTGGTGG-3' SEQ ID NO: 11),  
 (5'-GGTGGTGGTGGTTGTGGTGGTGGTGG-3' SEQ ID NO: 12),
- (5'-GGTGGTGGTGGTTGTGGTGGTGGTGGTTGTGGTGGTGGTGGTGGTGG TGG-3' SEQ ID NO:  
 25 13),
- (5'-GGTGGTTGTGGTGGTTGTGGTGGTTGTGGTGG-3' SEQ ID NO: 14),  
 (5'-TTTGGTGGTGGTGGTTGTGGTGGTGGTGGTTT-3' SEQ ID NO: 15),  
 (5'-GGTGGTGGTGGTTGTGGTGGTGGTGGTTT-3' SEQ ID NO: 16),  
 (5'-TTTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGG-3' SEQ ID NO: 17),  
 30 (5'-TGGTGGTGGT-3' SEQ ID NO: 18),  
 (5'-TTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG (SEQ ID NO: 20).
5. Aptámero para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la secuencia de nucleótidos del aptámero tiene una longitud de al menos 4 nucleótidos, preferentemente al menos 8 nucleótidos, más preferentemente al menos 12 nucleótidos y/o en el que la secuencia de nucleótidos del aptámero tiene una longitud de como máximo 120 nucleótidos, preferentemente como máximo 100 nucleótidos, más preferentemente como máximo 80 nucleótidos.
- 35 6. Aptámero para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el aptámero es capaz de interactuar con un autoanticuerpo, preferentemente un autoanticuerpo que es específico para un receptor acoplado a proteína G, preferentemente específico para uno cualquiera de los receptores acoplados a proteína G humanos receptor alfa 1 adrenérgico, receptor beta 1 adrenérgico, receptor beta 2 adrenérgico, receptor de endotelina 1 ETA, receptor muscarínico M, receptor de angiotensina II AT1, receptores PAR, receptor de MAS, receptor de 5HT4 y/o receptor M3.
- 40 7. Aptámero para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el aptámero es para su uso como ingrediente selectivo durante aféresis terapéutica de sangre constituyentes de la misma de un paciente que padece una enfermedad autoinmunitaria asociada con la aparición de autoanticuerpos contra receptores acoplados a proteína G.
- 45 8. Aptámero para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la enfermedad autoinmunitaria es una de miocardiopatía, miocardiopatía dilatada (MCD), miocardiopatía del periparto (MCP), miocardiopatía idiopática, miocardiopatía isquémica (MCI), miocardiopatía de Chagas, miocardiopatía inducida por quimioterapia, megacolon de Chagas, megaesófago de Chagas, neuropatía de Chagas, hiperplasia prostática benigna, esclerodermia, síndrome de Raynaud, preeclampsia, enfermedad oclusiva arterial periférica (EOAP), rechazo de aloinjerto de riñón, miocarditis, glaucoma, hipertensión, hipertensión pulmonar, hipertensión maligna, síndrome metabólico, alopecia, alopecia areata, migraña, enfermedad de Parkinson, epilepsia, cefalea en racimo, esclerosis múltiple, depresión, síndrome de dolor regional, angina de pecho inestable, lupus eritematoso sistémico (LES), esquizofrenia, síndrome de Sjögren, periodontitis, fibrilación auricular, vitíligo, síndrome urémico hemolítico, síndrome de la persona rígida y/o bloqueo cardíaco congénito.
- 50  
55

9. Uso de un aptámero de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 u 8 para la detección *in vitro* de un anticuerpo que es específico para un receptor acoplado a proteína G, preferentemente el receptor acoplado a proteína G humano receptor alfa-1 adrenérgico, receptor beta-1 adrenérgico, receptor beta-2 adrenérgico, receptor de endotelina 1 ETA, receptor muscarínico M, receptor de angiotensina II AT1, receptores PAR, receptor de MAS, receptor de 5HT4 y/o receptor M3, en el que el anticuerpo a detectar es un autoanticuerpo.
10. Uso del aptámero de acuerdo con la reivindicación 9, en el que el anticuerpo está presente en o deriva de un fluido corporal, preferentemente un fluido de un cuerpo humano, más preferentemente de sangre, plasma, suero, orina, heces, líquido sinovial, líquido intersticial, linfa, saliva, líquido cefalorraquídeo y/o líquido lacrimal humano.
11. Uso del aptámero de acuerdo con 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 para un receptor acoplado a proteína G, más preferentemente enfermedades autoinmunitarias asociadas con presencia en el suero del paciente de autoanticuerpos específicos para receptor alfa-1 adrenérgico, receptor beta-1 adrenérgico, receptor beta-2 adrenérgico, receptor de endotelina 1 ETA, receptor muscarínico M, receptor de angiotensina II AT1, receptores PAR, receptor de MAS, receptor de 5HT4 y/o receptor M3.
12. Aptámero para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el aptámero comprende la siguiente secuencia de nucleótidos (5'-GGTGGTGGTGGTTGTGGTGGTGG-3' SEQ ID NO: 12).
13. Uso del aptámero de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, en el que el aptámero comprende la siguiente secuencia de nucleótidos (5'-GGTGGTGGTGGTTGTGGTGGTGG-3' SEQ ID NO: 12).
14. Composición farmacéutica que comprende al menos un aptámero como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 y, opcionalmente, al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable para su uso en el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias asociadas con autoanticuerpos contra receptores acoplados a proteína G, en la que el aptámero es para su uso en el tratamiento de un paciente en el que pueden detectarse autoanticuerpos contra receptores acoplados a proteína G.
15. Composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 14, en la que la composición farmacéutica que comprende el aptámero se usa para inhibir la interacción de autoanticuerpos específicos para un receptor acoplado a proteína G con sus proteínas diana.
16. Columna de aféresis que comprende un aptámero de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, para su uso en el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria, en la que la enfermedad autoinmunitaria es miocardiopatía, miocardiopatía dilatada (MCD), miocardiopatía del periparto (MCPD), miocardiopatía idiopática, miocardiopatía isquémica (MCI), miocardiopatía de Chagas, miocardiopatía inducida por quimioterapia, megacolon de Chagas, megaesófago de Chagas, neuropatía de Chagas, hiperplasia prostática benigna, esclerodermia, síndrome de Raynaud, enfermedad oclusiva arterial periférica (EOAP), preeclampsia, rechazo de aloinjerto de riñón, miocarditis, glaucoma, hipertensión, hipertensión pulmonar, hipertensión maligna, síndrome metabólico, alopecia, alopecia areata, migraña, enfermedad de Parkinson, epilepsia, cefalea en racimo, esclerosis múltiple, depresión, síndrome de dolor regional, angina de pecho inestable, lupus eritematoso sistémico (LES), esquizofrenia, síndrome de Sjögren, periodontitis, fibrilación auricular, vitíligo, síndrome urémico hemolítico, síndrome de la persona rígida y/o bloqueo cardíaco congénito, en la que el aptámero es para su uso en el tratamiento de un paciente en el que pueden detectarse autoanticuerpos contra receptores acoplados a proteína G.
17. Columna de aféresis para su uso de acuerdo con la reivindicación 16, en la que el aptámero se usa como ingrediente selectivo para separar específicamente los autoanticuerpos a los que se dirige específicamente el aptámero.
18. Procedimiento de preparación de un oligonucleótido de aptámero que comprende las etapas de:
- I) determinación de una secuencia de nucleótidos para su uso como una secuencia de aptámero que comprende la aplicación del siguiente conjunto de normas de producción P:

$$\begin{aligned}
 P = \{ & \\
 S & \rightarrow M | Y | D | E | H \quad (1) \\
 M & \rightarrow NRM \quad (2) \\
 M & \rightarrow MR \quad (3) \\
 M & \rightarrow RM \quad (4) \\
 N & \rightarrow M \quad (5) \\
 D & \rightarrow YM \quad (6) \\
 E & \rightarrow VM \quad (6a)
 \end{aligned}$$



Y	→	K KL LK LKL	(7)
H	→	LV   V	(8)
R	→	L	(9)
Z	→	A   C   G   T	(10)
L	→	ZL   Z	(11)
BX	→	G <sup>X</sup>	(12)
CX	→	BXLBX	(13)
M	→	CXLCX	(14)
K	→	CXLBX	(15)
V	→	CXL	(16)
}			

con las condiciones de

- a.) Q es el conjunto de números naturales
- b.) F es un subconjunto de números naturales definido como

5  $F = \{X \in \mathbb{Q} \mid (X > 1)\}$

c.) Usando F se definen:

- (1)  $\forall X \in F \exists M : M \rightarrow CXLCX$
- (2)  $\forall X \in F \exists K : K \rightarrow CXLBX$
- (3)  $\forall X \in F \exists V : V \rightarrow CXL$
- 10 (4)  $\forall X \in F : CX \rightarrow BXLBX$
- (5)  $\forall X \in F : BX \rightarrow \prod_1^X G$

d.) U es un conjunto de no terminales definido como

$$U = \{S, M, N, D, E, Y, H, R, Z, L, BX, CX, K, V\}$$

Para BX y CX véase c)

- 15 e.) W es un conjunto de no terminales definido como

$$W = \{A, C, G, T, G^X\}$$

G<sup>X</sup> indica todos los terminales que pueden obtenerse de acuerdo con b.) y c.) (5)

f.) S ∈ U es el símbolo de partida

20 en la que “A” significa un nucleótido de adenina, “C” significa un nucleótido de citosina, “E” significa un nucleótido de guanina y “T” significa un nucleótido de timina si la secuencia de nucleótidos es una secuencia de ADN y “T” significa un nucleótido de uracilo si la secuencia de nucleótidos es una secuencia de ARN,

en el que la secuencia de nucleótidos para su uso como una secuencia de aptámero no comprende la secuencia de nucleótidos GGTTGGTGTGGTTGG (SEQ ID NO: 22), GGTTGGTGTGGT (SEQ ID NO: 23) o CGCCTAGGTTGGGTAG- GGTGGTGGCG (SEQ ID NO: 24),

25 en el que la secuencia de nucleótidos para su uso como una secuencia de aptámero tiene una longitud de como máximo 593 nucleótidos, y

II) producir un oligonucleótido de aptámero que tiene la secuencia de nucleótidos obtenida en la etapa I).

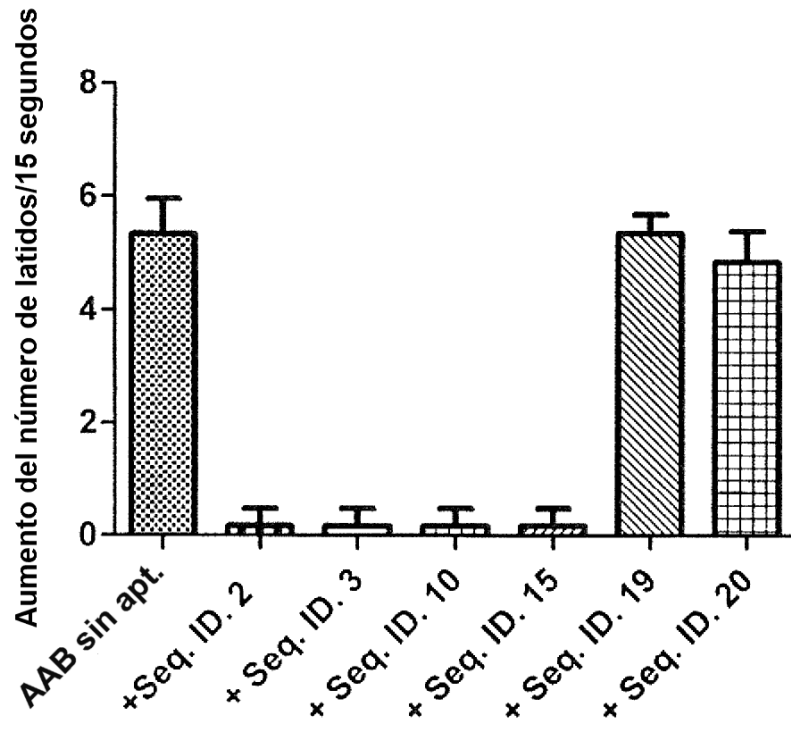


Figura 1

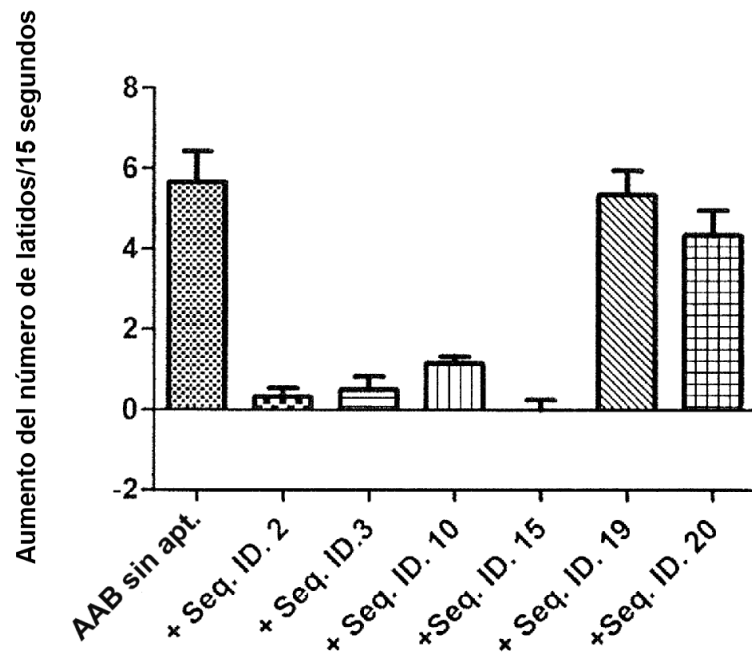


Figura 2

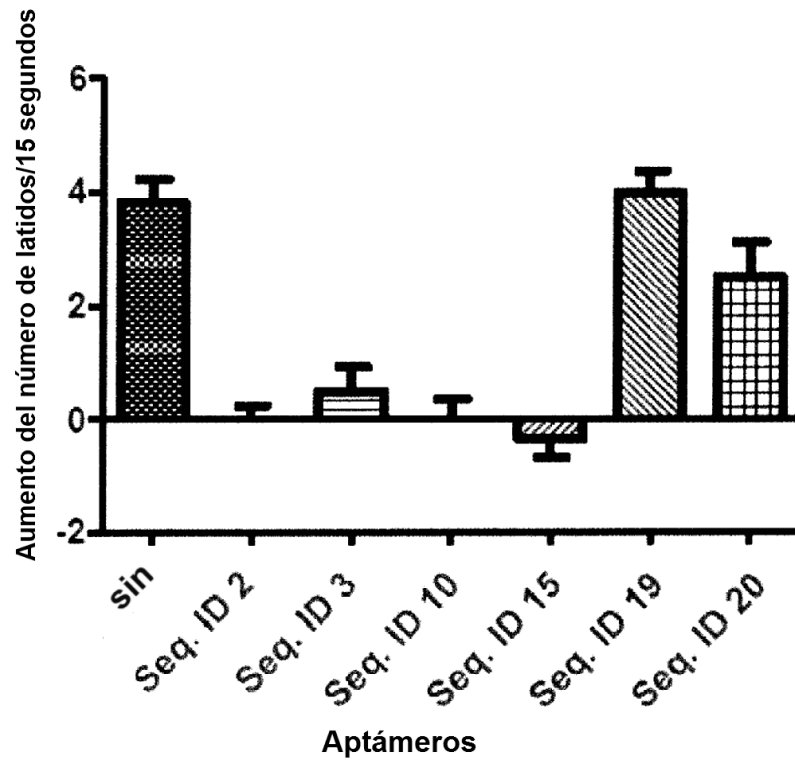


Figura 3

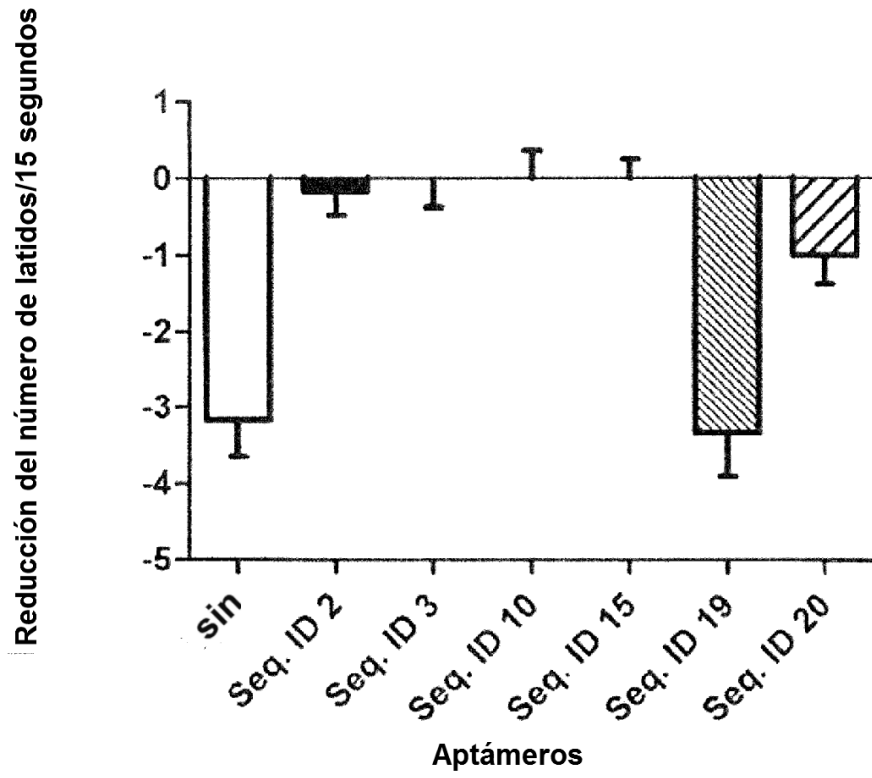


Figura 4

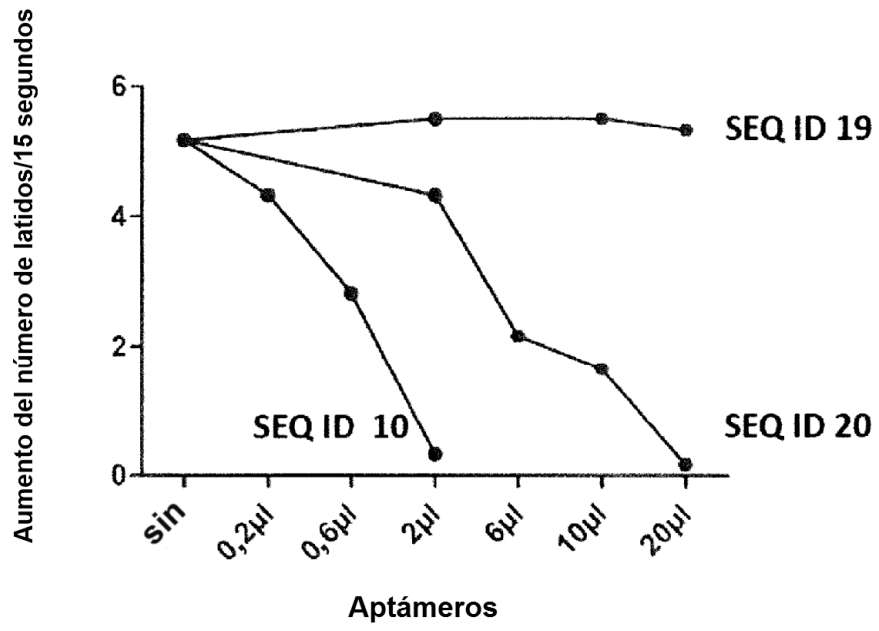


Figura 5

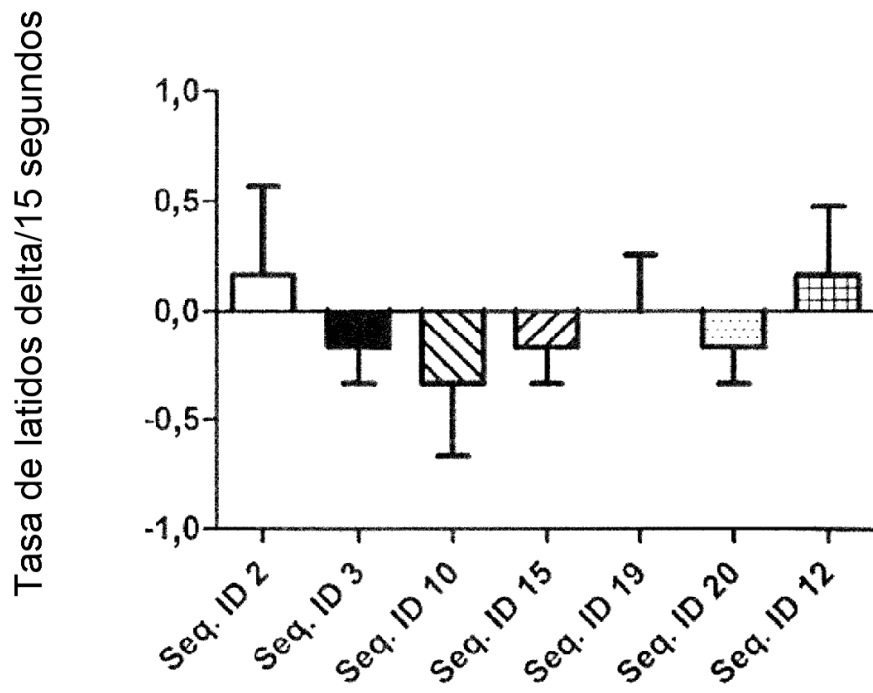


Figura 6

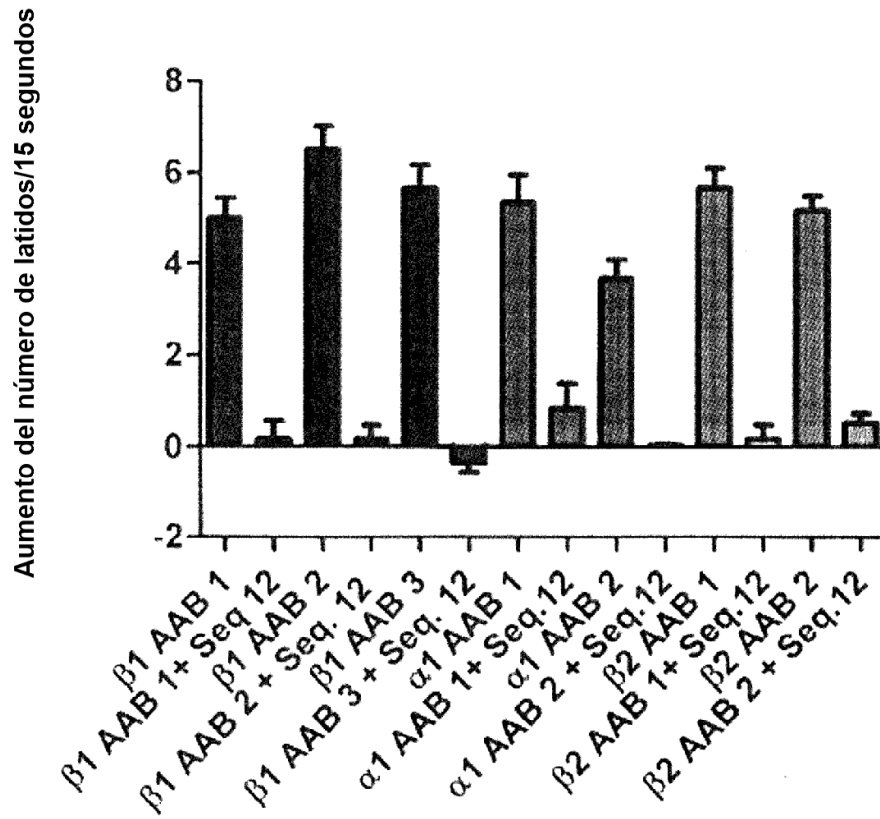


Figura 7



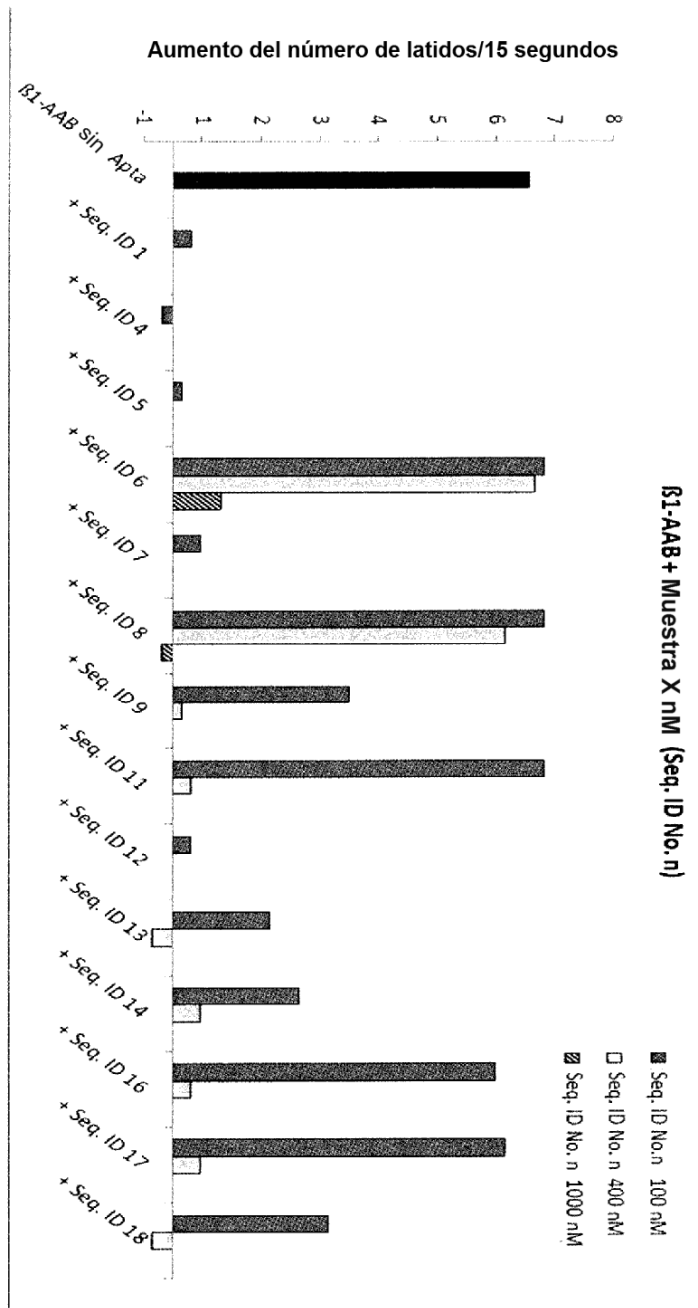


Figura 8

Secuencia	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	
25	1																										
26		1																									
27			1																								
28				1																							
29					1																						
30						1																					
31							1																				
32								1																			
33									1																		
34										1																	
35											1																
36												1															
37													1														
38														1													
39															1												
40																1											
41																	1										
42																		1									
43																			1								
44																				1							
45																					1						
46																						1					
47																							1				
48																								1			
49																									1		
50																										1	

Figura 9

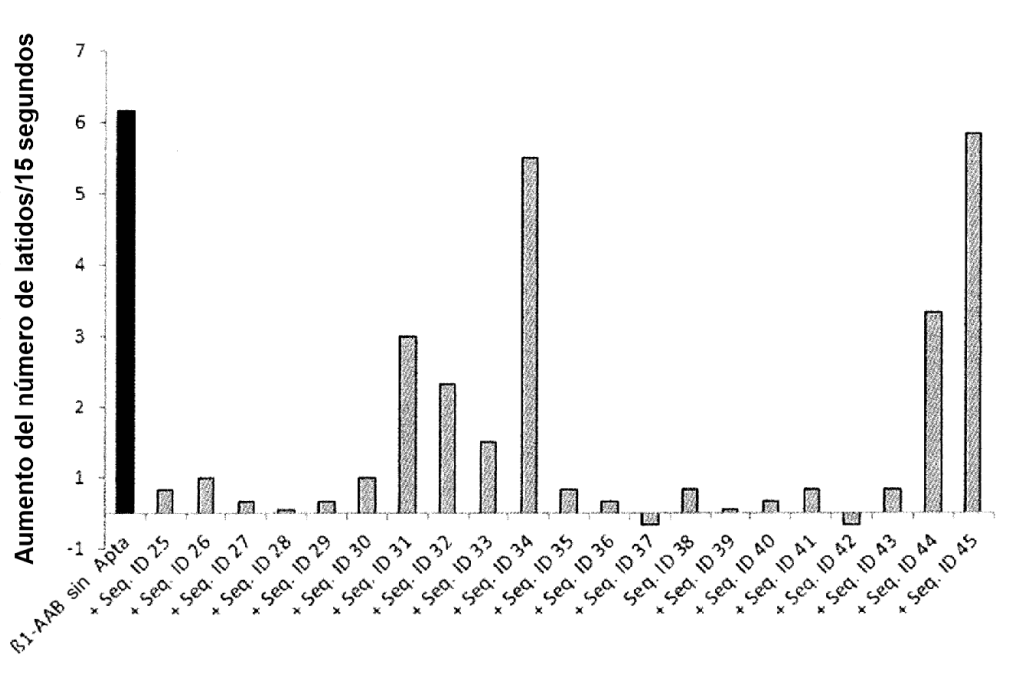


Figura 10

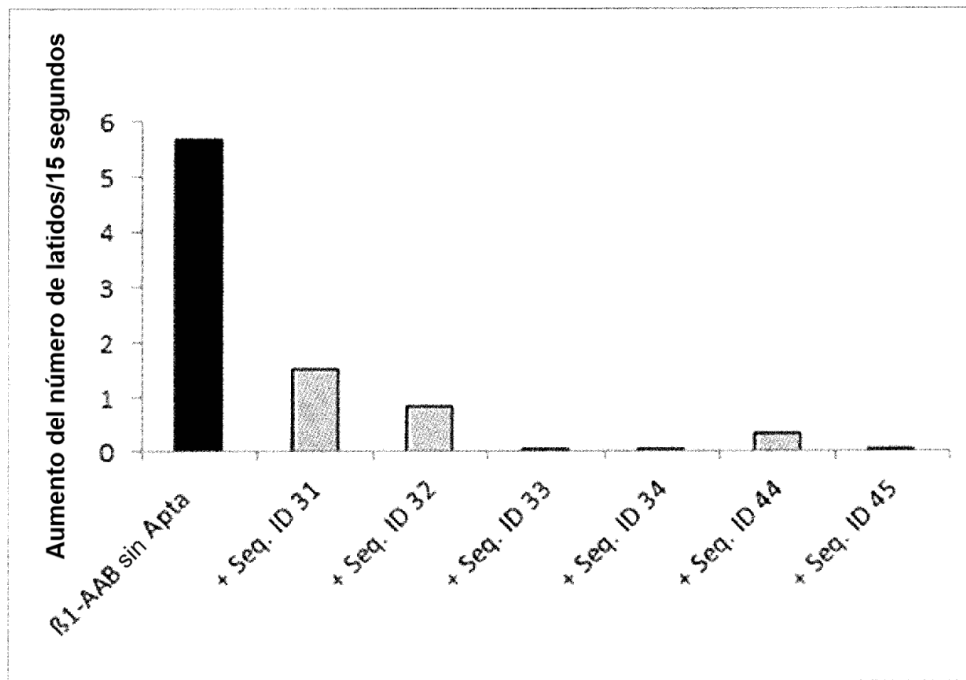


Figura 11

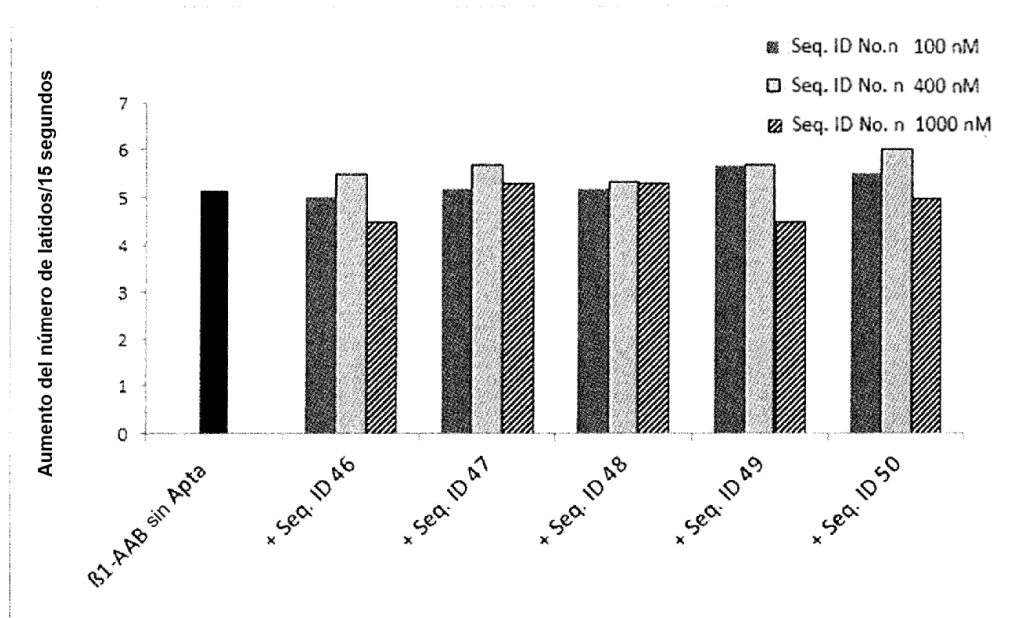


Figura 12

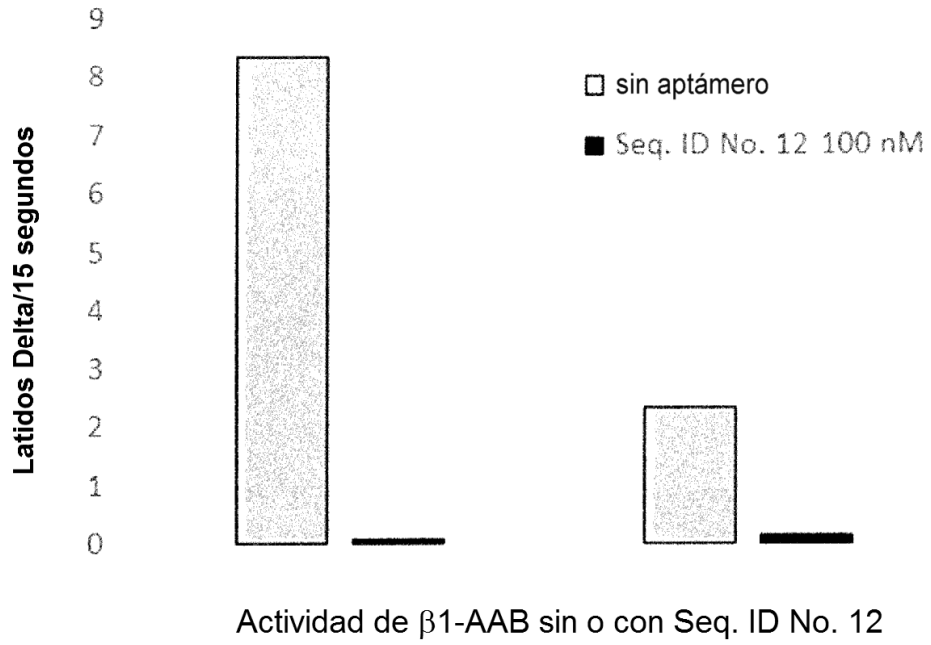


Figura 13

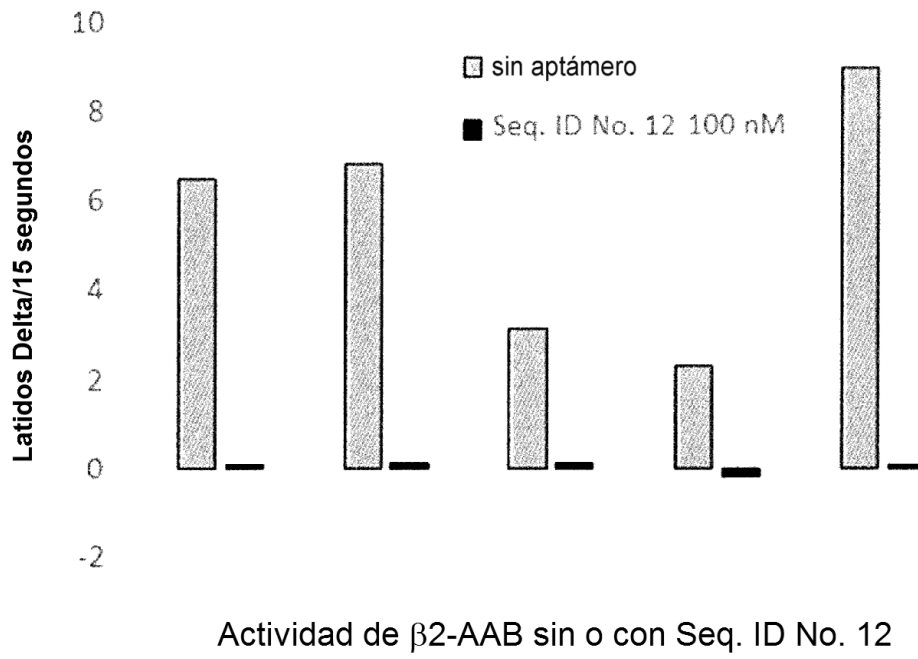


Figura 14

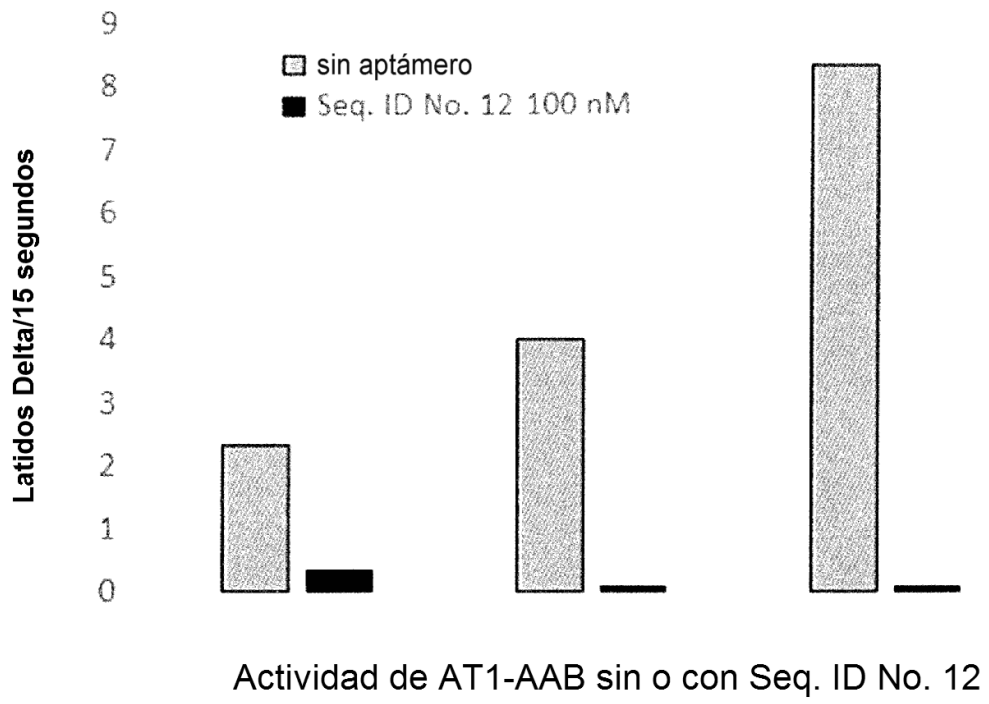
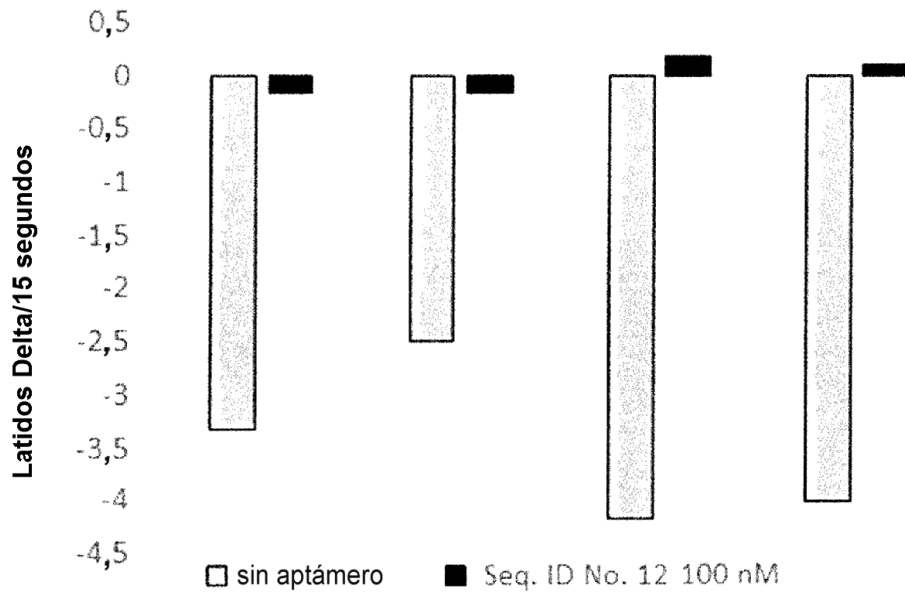


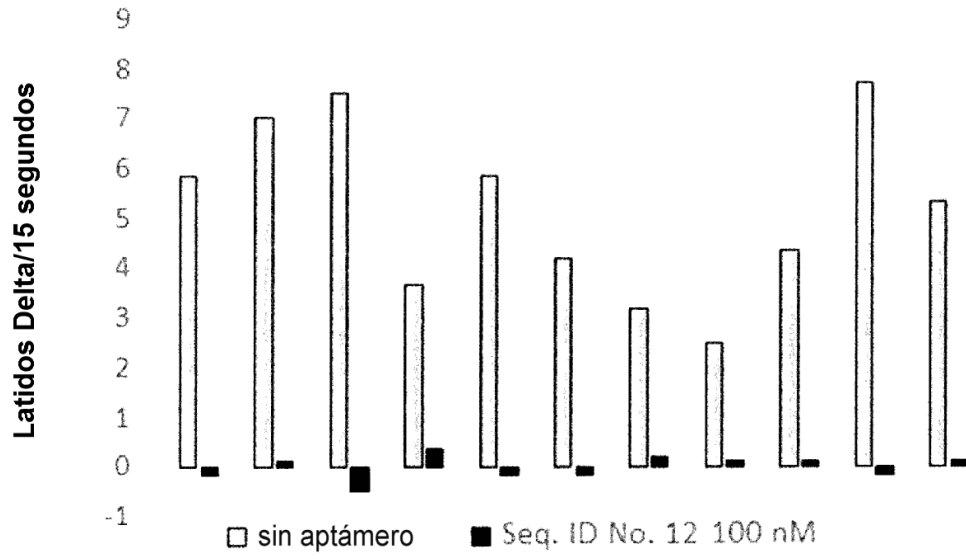
Figura 15





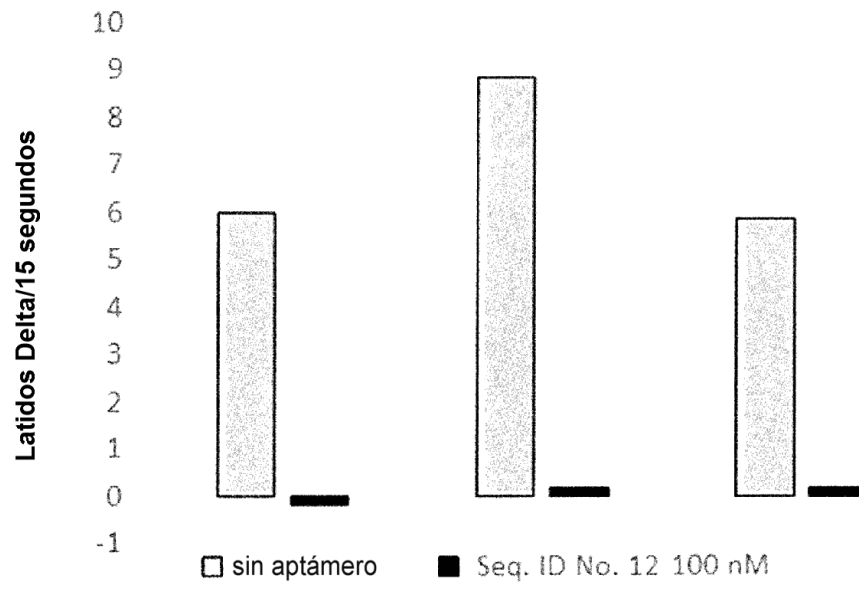
Actividad de ETA-AAB sin o con Seq. ID No. 12

Figura 16



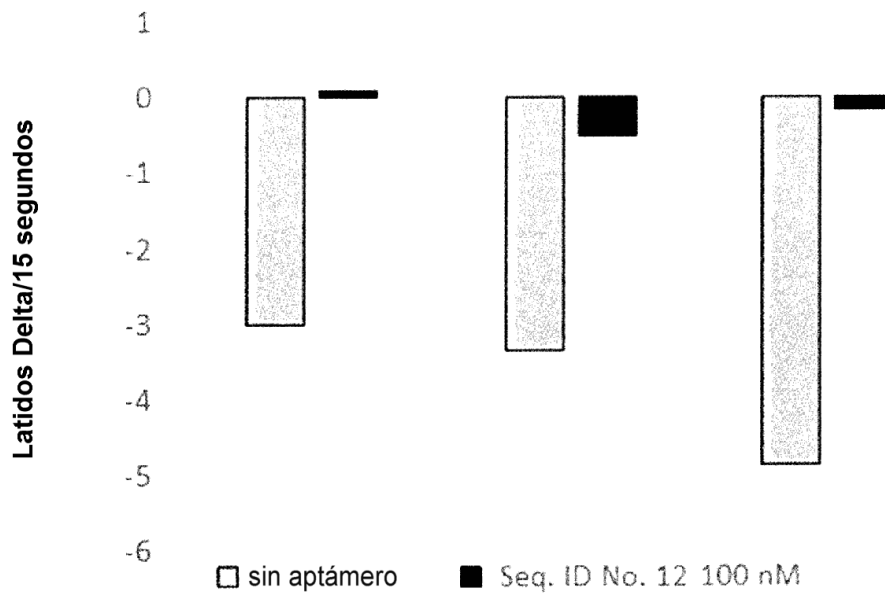
Actividad de alfa1-AAB sin o con Seq. ID No. 12

Figura 17



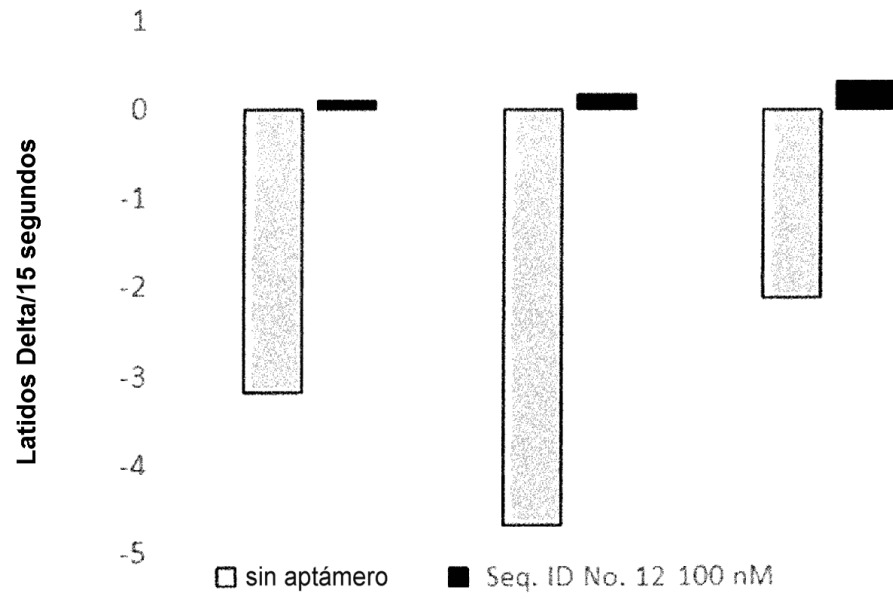
Actividad de PAR-AAB sin o con Seq. ID No. 12

Figura 18



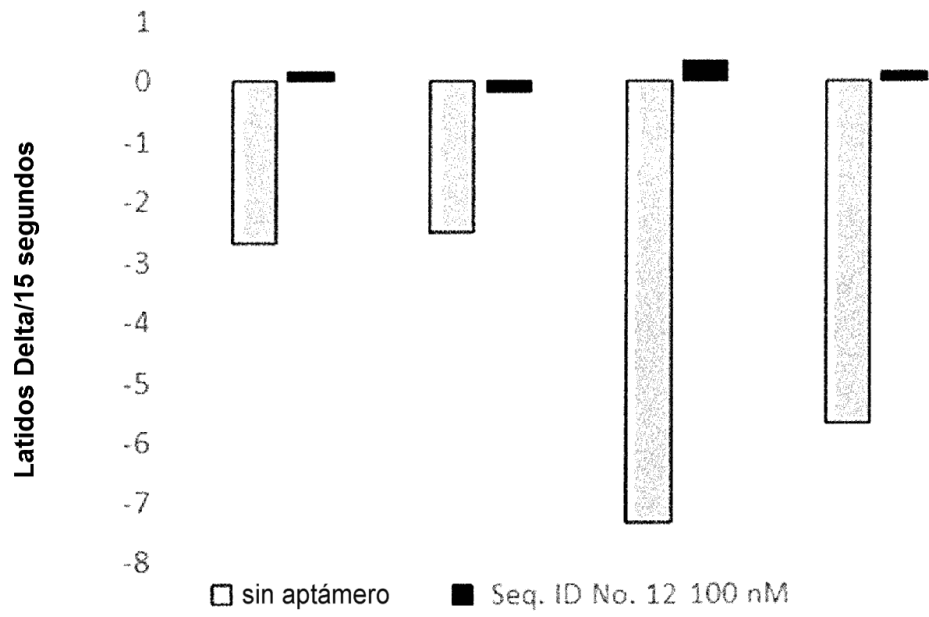
Actividad de MAS-AAB sin o con Seq. ID No. 12

Figura 19



Actividad de 5HT4-AAB sin o con Seq. ID No. 12

Figura 20



Actividad de M2-AAB sin o con Seq. ID No. 12

Figura 21