

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 672 195**

51 Int. Cl.:

C12N 15/115 (2010.01)

A61K 31/7088 (2006.01)

A61P 17/00 (2006.01)

A61Q 19/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.12.2013 PCT/EP2013/077801**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.07.2014 WO14102213**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.12.2013 E 13811573 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.03.2018 EP 2935587**

54 Título: **Aptámeros inhibidores de la actividad enzimática de la tirosinasa**

30 Prioridad:

24.12.2012 FR 1262754

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
13.06.2018

73 Titular/es:

**LVMH RECHERCHE (50.0%)
185 avenue de Verdun
45800 St. Jean de Braye, FR y
INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA
RECHERCHE MÉDICALE (INSERM) (50.0%)**

72 Inventor/es:

**CAUCHARD, JEAN-HUBERT;
KURFURST, ROBIN;
SCHNEBERT, SYLVIANNE;
DAUSSE, ERIC y
TOULME, JEAN-JACQUES**

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 672 195 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 inhibidores de la actividad enzimática de la tirosinasa.

5 La invención se refiere al campo de las aplicaciones dermocosméticas y dermatológicas despigmentantes o aclaradoras.

10 En el ser humano, la pigmentación es el resultado de la síntesis y de la distribución de los pigmentos melánicos en la piel, los folículos pilosos o los ojos. La pigmentación está genéticamente predefinida. Los genes que controlan la pigmentación actúan directamente sobre la célula pigmentaria, o indirectamente sobre el entorno de esta última, en particular los queratinocitos.

15 Se han identificado y caracterizado numerosos genes que actúan sobre la célula pigmentaria, cuyos productos son unas proteínas que controlan la síntesis de las melaninas, de las proteínas de estructura de los melanosomas, o que controlan la biogénesis y el transporte de los melanosomas.

20 Entre los factores exógenos que estimulan la melanogénesis, están en primer lugar los rayos ultravioletas. La inflamación y los estreses oxidativos tales como por ejemplo los desencadenados por la contaminación estimulan la síntesis de melanina. Estos estreses actúan directamente sobre los melanocitos y también indirectamente por activación de los queratinocitos que liberarán entonces unos factores tales como unas citoquinas o unas hormonas. Estos factores, tales como las interleucinas, la alfa MSH, la endotelina 1, las prostaglandinas E2, desencadenarán la cascada de reacciones que conducen a la síntesis de la melanina. Estas estimulaciones repetidas asociadas a unos trastornos de la unión dermo-epidérmica son el origen de la formación de una pigmentación cutánea heterogénea que se manifiesta por ejemplo por la aparición de efélides, melasmas o también de lentigos.

30 Provocadas por un exceso de melanina en la piel, las hiperpigmentaciones son la consecuencia de factores intrínsecos (factores endocrinos, metabólicos, genéticos) o extrínsecos (agentes fotosensibilizantes, físicos, químicos, inflamatorios, etc.) a veces estrechamente relacionados y difíciles de precisar. La mayoría de las hiperpigmentaciones son el resultado de una sobreactividad melanocitaria que conduce a una superproducción de melanina. Estas hiperpigmentaciones aparecen a nivel de la cara o de las manos y se manifiestan por unas zonas o unas manchas más oscuras o más coloreadas que confieren a la piel una heterogeneidad pigmentaria.

35 Todos los pigmentos melánicos proceden de una vía de síntesis común, que utiliza un aminoácido, la tirosina y una enzima clave, la tirosinasa que puede estar libre o en forma de un complejo tirosinasa/proteína relacionada con tirosina 1. La tirosinasa transforma la tirosina en DOPA, y después en DOPAquinona. A partir de la DOPAquinona son posibles dos vías, una conduce a la feomelanina y la otra a la eumelanina. En la vía de las eumelaninas, la dopaquinona conduce a la formación de dopacromo. El dopacromo a través de la formación de dihidroxiindol o de dihidroxiindolcarboxilo conduce a la formación de eumelanina. La tirosinasa es la enzima clave de esta cascada de reacciones que conduce a la formación de melanina catalizando solo o como complejo con la proteína relacionada con la tirosinasa 1, varias reacciones de esta cascada.

40 De esta manera, con el fin de prevenir las hiperpigmentaciones e inhibir la melanogénesis, es importante inhibir e incluso suprimir la actividad de la tirosinasa en la piel.

45 Los melanocitos expresan la tirosinasa. Así, se ha previsto desarrollar unos inhibidores específicos de la tirosinasa.

50 Según varios tipos de mecanismos pueden actuar compuestos químicos, naturales, o sintéticos, los agentes reguladores de la pigmentación cutánea:

- o bien bloqueando la estimulación de los melanocitos por los queratinocitos
- o bien bloqueando la vía de síntesis de la melanina a un nivel determinado
- o bien bloqueando la transferencia de los melanosomas
- 55 - o bien disminuyendo el número de melanocitos.

Entre estos mecanismos de acción, los agentes despigmentantes pueden ser unos inhibidores de la actividad enzimática de la tirosinasa.

60 Los primeros activos de regulación de la pigmentación cutánea, los inhibidores de la actividad enzimática de la tirosinasa utilizados, han sido las sales de mercurio, el cloruro mercúrico, el cloruro de amina mercurio. El mercurio que entra en competición con el cobre, inhibe la actividad de la tirosinasa, suprimiendo las dos primeras fases de la síntesis de la melanina. Sin embargo, el mercurio es una sustancia muy tóxica. Se han propuesto la hidroquinona, ésteres de la hidroquinona o derivados. Actúa por inhibición competitiva de la tirosinasa. Sin embargo, induce unas alteraciones mitocondriales y unos efectos secundarios como irritaciones o alergias. Unos estudios toxicológicos realizados en estas sustancias han mostrado un riesgo de inhibición de la espermatogénesis y de cáncer cutáneo.

5 M. Tareq Hassan Khan *et al.*, (Minerva Biotecnologica, vol. 18, diciembre de 2006, páginas 171-179)) describe un aptámero ADN virtual susceptible de interactuar con una tirosinasa de hongo. La utilización tópica de sustancias despigmentantes eficaces e inofensivas es particularmente buscada en cosmética y en dermatología. En particular, estas sustancias se utilizan para tratar hiperpigmentaciones regionales por hiperactividad melanocitaria, tales como los melasmas idiopáticos, las hiperpigmentaciones localizadas por hiperactividad hipermelanocitaria, tales como las manchas pigmentarias denominadas lentigos solares y lentigos seniles, las hiperpigmentaciones accidentales tales como la fotosensibilización o la cicatrización posterior a la lesión, pero también para leucodermias tales como el vitiligo. En estos últimos casos, a falta de volver a pigmentar la piel, se atenúa la pigmentación de la periferia de las áreas despigmentadas para dar a la piel un color más homogéneo.

10 Se utilizan también unas sustancias despigmentantes como agentes aclaradores de la piel, en particular las mencionadas anteriormente, que son muy reactivas a los rayos UV, para aclarar la piel, especialmente la de la cara y las manos, con el fin de conservar un color de piel lo más claro posible o también reducir los efectos pigmentantes de los rayos UV.

15 El objetivo de la invención es resolver los problemas mencionados anteriormente de las técnicas de la técnica anterior y proponer una composición cosmética particularmente ventajosa para inhibir la actividad enzimática de la tirosinasa.

20 **Resumen de la invención**

La invención tiene por objeto un nuevo inhibidor de tirosinasa eficaz por vía tópica para inhibir la melanogénesis, estable en un medio cosméticamente aceptable y no irritante, no tóxico y/o no alergénico.

25 La invención tiene asimismo por objeto un nuevo agente despigmentante que actúa sobre el procedimiento de melanogénesis, destinado, por una parte, en el caso de pigmentación sustancialmente homogénea, al aclaramiento de la piel, del pelo o del cabello, es decir, a disminuir su pigmentación, y por otra parte, para luchar contra la hiperpigmentación cutánea, es decir, cuando la piel tiene una heterogeneidad de pigmentación.

30 Los inventores han observado de manera sorprendente que un aptámero de ADN resistente a las nucleasas capaz de unirse específicamente a la tirosinasa y que inhibe la actividad tirosinasa cumplía todos estos criterios. En particular, es capaz de penetrar en las células de la piel.

35 Para aislar aptámeros anti-tirosinasa, los inventores usaron un banco de secuencias oligonucleotídicas fosfodiéster (la misma composición que el ADN natural). La selección se realizó de manera dirigida para identificar, aislar y caracterizar secuencias que pueden interactuar específicamente con la tirosinasa.

40 Estos aptámeros se probaron luego para su capacidad de inhibir la actividad de la tirosinasa.

Un primer objeto de la invención se refiere por lo tanto a un aptámero de ADN que comprende la secuencia SEC ID n°: 5, preferentemente resistente a nucleasas, capaz de inhibir la actividad enzimática de la tirosinasa y la conversión de la tirosina en L-DOPA. y Dopaquinona.

45 Un segundo objeto de la invención se refiere a la utilización de un aptámero según la invención para inhibir la actividad enzimática de la tirosinasa.

50 Un tercer objeto de la invención se refiere a una composición cosmética o farmacéutica que comprende como ingrediente activo un aptámero según la invención en una cantidad suficiente para inhibir la tirosinasa y uno o varios excipientes farmacéuticamente aceptables.

Un cuarto objeto de la invención se refiere a la utilización cosmética de un aptámero según la invención.

55 Un quinto objeto de la invención se refiere a un aptámero según la invención como medicamento. La especificación también describe un procedimiento de selección de un aptámero según la invención que comprende las etapas siguientes:

- Selección en un banco de ADN de aptámeros mediante el procedimiento SELEX contra el sitio catalítico de la tirosinasa,
- evaluación del potencial para inhibir la actividad enzimática de la tirosinasa de los aptámeros identificados en la etapa anterior,
- clonación y secuenciación de los aptámeros así seleccionados.

65

Breve descripción de figuras

- Figura 1: Estructuras secundarias pronosticadas del aptámero T10.1 y sus versiones truncadas.
- 5 Figura 2: Sensorgrama del complejo aptámero T10.1 -Tirosinasa
- Figura 3: Medición de la modulación de la actividad tirosinasa por diferentes aptámeros procedentes de la ronda 10.
- 10 Figura 4: Curva $(P) = f(t)$, relación entre la aparición del producto P y el tiempo t

Descripción detallada de la invención

15 Un primer objeto de la invención, por lo tanto, se refiere a un aptámero de ADN que comprende la secuencia SEC ID n°: 5, preferentemente resistente a las nucleasas, capaz de inhibir la actividad enzimática de la proteína tirosina de conversión de la tirosina en L-DOPA.

20 Se refiere por "aptámero" una molécula de ADN o de ARN ligando específico y de fuerte afinidad de una proteína. Esta acepción incluye por consiguiente los aptámeros "naturales" y los análogos modificados químicamente.

25 Los aptámeros se seleccionan por alternancia selección/amplificación que permite dirigir la evolución de la población según un modo darwiniano: en la población, se seleccionan las moléculas más aptas, de ahí el nombre "aptámeros" dado a los oligonucleótidos que tienen el carácter deseado, procedentes de la selección. Las técnicas convencionales de ingeniería genética (clonación, secuenciación, expresión) permiten identificar fácilmente estos aptámeros individualmente, caracterizarlos y luego producirlos en cantidad.

30 La selección de aptámeros se puede realizar mediante un protocolo de selección *in vitro* optimizado, conocido con el nombre de "SELEX" (Systemic Evolution of Ligands by Exponential enrichment) (WO 91/19813).

35 El procedimiento SELEX permite generar unos ligandos de gran afinidad y especificidad en grandes cantidades. Este enfoque se basa en la puesta en contacto de la molécula diana con un banco de ligandos potenciales. Un sistema de ciclos de desorción/selección permite enriquecer la población de los ligandos que interactúan más específicamente con la molécula diana. La población obtenida finalmente es aislada y caracterizada a continuación permitiendo su resíntesis a gran escala.

40 Aunque se ha establecido el procedimiento SELEX como una técnica general para seleccionar aptámeros, no es previsible ni está estandarizado para cualquier diana. Por el contrario, el procedimiento SELEX debe ser optimizado y estar adaptado para cada diana particular. El procedimiento SELEX no está garantizado para cualquier diana.

45 Varios factores son importantes para una selección de aptámeros. Por ejemplo, la molécula diana debe ser estable y fácilmente reproducible en cada ciclo de SELEX, porque el procedimiento SELEX implica varios ciclos de unión, selección y amplificación. Además, los ácidos nucleicos que muestran una unión específica a la diana deben estar presentes en el banco inicial. Por lo tanto, es necesario producir un banco inicial de ácidos nucleicos muy diversificado.

50 La selección de aptámeros utilizando el procedimiento SELEX es imprevisible. Aunque todos los factores sean óptimos para la selección del aptámero, el procedimiento SELEX no siempre permite obtener aptámeros viables para cada diana.

55 El banco inicial de candidatos está compuesto por secuencias de ADN sintetizadas químicamente, teniendo, cada una, una región variable larga de n nucleótidos flanqueada, en 3' y en 5', por regiones fijas idénticas para todos los candidatos del banco. Estas regiones fijas permiten la manipulación de la parte central durante el SELEX, en particular la amplificación por PCR. El tamaño de la porción variable dicta la diversidad del banco que es igual a 4^n ya que cada posición puede ser ocupada por uno de los cuatro nucleótidos A, T, G o C. Para unas ventanas de gran tamaño, se alcanzan unas complejidades gigantescas: para $n = 50$ la diversidad teórica es 4^{50} o bien 10^{30} , un valor inaccesible en la práctica ya que corresponde a más de 10^5 toneladas para un banco en el que cada secuencia está representada una vez. El límite experimental se sitúa alrededor de 10^{15} secuencias diferentes, o sea el de un banco en el que están representados todos los candidatos que tienen una región variable de 25 nucleótidos. Si se elige manipular un banco que comprende una ventana de 30 nucleótidos cuya diversidad teórica es de aproximadamente 10^{18} , entonces solo se explorará 1/1000 de las posibilidades. En la práctica, esto suele ser suficiente para obtener aptámeros con las propiedades deseadas. Por otra parte, como las polimerasas utilizadas son infieles e introducen errores a una tasa del orden de 10^{-4} , contribuyen a enriquecer significativamente la diversidad del conjunto de secuencias a lo largo del procedimiento SELEX: un candidato de cada 100 se modificará en cada ciclo de amplificación para un banco con una región aleatoria de 100 nucleótidos, lo que dará lugar a la aparición de 10^{13} nuevos candidatos para el banco total.

- La selección tiene lugar en cada ronda, por separación física entre moléculas asociadas a la diana y moléculas libres. Se pueden utilizar múltiples técnicas (cromatografía, retención sobre filtro, electroforesis, etc.). Las condiciones de la selección se ajustan (concentración relativa diana/candidatos, concentración iónica, temperatura, lavado etc.) para que una intervenga una competición entre los candidatos para fijarse a la diana. De una manera general, la astringencia aumenta en las rondas para favorecer la captura de los candidatos más afines. Además, se lleva a cabo una contra-selección para eliminar los candidatos que reconocen el soporte (filtro, bolas, etc.)
- Los oligonucleótidos son unos oligoaniones, teniendo cada motivo unitario una carga a pH neutro, unos sitios dadores/aceptores de unión hidrógeno y un heterociclo aromático (la base nucleica) que puede generar unas interacciones de apilamiento. Estos oligómeros se repliegan tras la formación de pares de bases, para generar unas estructuras secundarias y terciarias. El banco de secuencias iniciales es, por lo tanto, un banco de formas tridimensionales, correspondiendo cada una a una distribución de motivos, susceptibles de iniciar unas interacciones electrostáticas, dar lugar a unos enlaces H, etc. La selección equivale a identificar en el banco la forma adaptada a la diana, es decir, la que permite el mayor número de interacciones, la formación del complejo aptámero-diana, más estable. Para dianas de pequeño tamaño (colorantes, antibióticos etc.) los aptámeros identificados se caracterizan por unas constantes de equilibrio de disociación del orden del micromolar, mientras que para dianas proteicas, no son raros los K_d inferiores a 10^{-9} M.
- Se han previsto unas dianas muy variadas para generar aptámeros: aminoácidos, péptidos, proteínas o enzimas, pero también estructuras complejas como virus intactos o células vivas.
- La propiedad más notable de los aptámeros es la especificidad de las interacciones iniciadas con su ligando, lo cual los convierte en agentes de primer plano para el reconocimiento de una diana.
- Los aptámeros pueden ser unos oligodesoxi- (ADN) o unos oligorribonucleótidos (ARN). En este último caso, la primera etapa del SELEX consiste en una transcripción del banco inicial de ADN, comprendiendo la parte fija 5' de los candidatos una secuencia promotora. Después de la selección, los candidatos se convierten en ADN mediante transcripción inversa antes de ser amplificados. Unos aptámeros ARN y ADN con características comparables se seleccionaron contra una misma diana. Además, los dos compuestos son inhibidores competitivos entre sí, lo que sugiere un recubrimiento de los sitios de interacción. Esto tiene importantes consecuencias para la realización de los aptámeros químicamente modificados.
- El desarrollo del enfoque antisentido ha conducido a la síntesis de un gran número de análogos, algunos de los cuales, por ejemplo, confieren al oligómero una resistencia a las nucleasas, una propiedad útil para una utilización en un entorno biológico (medio de cultivo celular o *in vivo*). Unas modificaciones del enlace fosfodiéster, azúcar o esqueleto fosfato-azúcar tales como los derivados de 2'-O-metilo, ácido nucleico "locked" o borano-fosfato conducen a unos oligómeros resistentes a las nucleasas. Esta propiedad puede ser de interés para los aptámeros. Sin embargo, como se ha mencionado anteriormente, el cambio completo de la estructura química *a posteriori* de un aptámero seleccionado en forma de ARN o ADN conduce generalmente a una disminución o incluso a una pérdida de las propiedades para las cuales se ha seleccionado. Esto no significa que no sea posible introducir modificaciones en ciertas posiciones. Pero es conveniente identificar las posiciones en las que se toleran las modificaciones. Esto se puede realizar mediante pruebas de variantes puntuales o mediante un enfoque sistemático llamado de interferencia química que es una variante de la cartografía por huella.
- Por supuesto, es preferible realizar directamente la selección de oligonucleótidos no naturales. Esto supone que los nucleósidos trifosfatos modificados se incorporen de manera eficaz y las matrices modificadas sean leídas correctamente por las polimerasas utilizadas durante el SELEX. Una cantidad muy pequeña de análogos satisface las exigencias. En lo que respecta a los derivados que confieren una resistencia a las nucleasas, las posibilidades se limitan a los análogos de fosforotiato, boranofosfato, 2'-metilo, 2'-amino o 2'-fluoro-pirimidina, siendo estos últimos, sin duda, los utilizados más comúnmente. Los aptámeros identificados en este caso tienen unos nucleósidos pirimidínicos modificados y unos residuos púricos no modificados (2'-hidroxilo). Estas moléculas tienen una resistencia incrementada a las nucleasas. Si es necesario, se pueden introducir *a posteriori* unos residuos púricos modificados, como se ha indicado anteriormente. Por otro lado, es posible seleccionar unos oligonucleótidos que comprendan unos sustituyentes en la posición C(5) de las pirimidinas o N(7), C(8) de las purinas. Esto no tiene ningún efecto sobre la sensibilidad a las nucleasas, pero permite añadir nuevas funcionalidades (hidrofobicidad, fotoreactividad etc.).
- Un enfoque muy diferente se refiere a la utilización de isómeros ópticos. Los ácidos nucleicos naturales son los isómeros D. Los análogos L son resistentes a las nucleasas pero no pueden ser producidos por las polimerasas. Según las leyes del isomería óptica, un aptámero en serie L formará con su diana C un complejo que tiene las mismas características que el complejo formado por el isómero en serie D y el enantiómero C' de la diana C. Por lo tanto, si se puede sintetizar químicamente el compuesto C', será utilizado para llevar a cabo la selección de un aptámero natural (D). Una vez identificado, este aptámero se sintetizará químicamente en serie L. Este aptámero L será un ligando de la diana natural C.

Otro enfoque, descrito recientemente como SELEX bidimensional, utiliza simultáneamente la selección *in vitro* de oligonucleótidos y la química combinatoria dinámica (CCD), es decir la utilización de una reacción reversible entre algunos grupos del oligonucleótido (grupos amina) y un banco de compuestos aldehídicos. La reacción da como resultado la producción de oligonucleótidos iminas que se seleccionan según los mismos principios que para el SELEX clásico. Por lo tanto, ha sido posible identificar para una diana ARN en horquilla aptámeros modificados que difieren de los aptámeros naturales.

Al contrario que las modificaciones de esqueleto que pueden alterar la estructura y que necesitan que se tomen precauciones antes de ser introducidas, bajo pena que pierdan las propiedades de interacción del aptámero con su diana, es posible conjugar diferentes grupos en uno de los extremos 3' o 5' del oligonucleótido para convertirlo en una herramienta, sonda o sensor sin alterar sus características. Esta versatilidad constituye por otro lado un gran interés por los aptámeros, especialmente en perspectivas diagnósticas.

El término "análogo de aptámero" se entiende en la presente memoria una o varias de las modificaciones descritas anteriormente.

Preferentemente, el aptámero según la invención es capaz de unirse con fuerte afinidad a la tirosinasa.

En el sentido de la presente invención, se entiende por "fuerte afinidad" una interacción específica del aptámero con diana y con una constante de disociación suficientemente baja para permitir la inhibición significativa de la actividad catalítica de la enzima. El aptámero según la invención comprende por lo menos la secuencia SEC ID nº: 5. Preferentemente, el aptámero según la invención comprende por lo menos una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en SEC ID nº: 1, SEC ID nº: 2, SEC ID nº: 3, SEC ID nº: 4 y SEC ID nº: 6.

La secuencia SEC ID nº: 1 se seleccionó mediante el procedimiento SELEX.

Las SEC ID nº: 2 a 5 son unos derivados acortados de SEC ID nº: 1.

La secuencia SEC ID nº: 6 corresponde a la parte de SEC ID nº: 1 sin los cebadores.

La siguiente tabla 1 resume estas secuencias.

Tabla 1: Secuencias de los aptámeros de ADN acortados procedentes del aptámero T10.1 representado al 42% en la ronda 10.

T10.1 SEC ID nº:1	<p>GCCTGTTGTGAGCCTCCTGTCGAACGCAATGGGCGCAGATTGGAAGGCCTAGCATTGAGCGTTTATTCTTGCTCCC</p> <p>SEC ID nº:7 SEC ID nº:6 SEC ID nº:8</p>	SEC ID nº: 1
T10.1A SEC ID nº: 2	GCCTCCTGTCGAACGCAATGGGCGCAGATTGGAAGGC	SEC ID nº: 2
T10.1B SEC ID nº: 3	CCCTGTCGAACGCAATGGGCGCAGATTGGG	SEC ID nº: 3
T10.1C SEC ID nº: 4	CCCGAACGCAATGGGCGCAGGG	SEC ID nº: 4
T10.1D SEC ID nº: 5	CGCAATGGGCG	SEC ID nº: 5

También preferentemente, el aptámero según la invención comprende por lo menos 10 nucleótidos contiguos de la SEC ID nº: 6 flanqueada en 5' de uno a varios nucleótidos contiguos de la secuencia SEC ID nº: 7 a partir de su extremo 3' y/o flanqueada en 3' de uno a varios nucleótidos contiguos de la secuencia SEC ID nº: 8 a partir de su extremo 5'.

También preferentemente, el aptámero según la invención comprende la SEC ID nº: 6 flanqueada en 3' de uno a varios nucleótidos contiguos de la secuencia SEC ID nº: 7 a partir de su extremo 5' y/o flanqueada en 5' de uno a varios nucleótidos contiguos de la secuencia SEC ID nº: 8 a partir de su extremo 3'.

Se entiende por "uno o varios" todos los nucleótidos, preferentemente de 3 a 10, particularmente preferida 5 nucleótidos.

Se pueden citar, por ejemplo, las secuencias:

- SEC ID nº: 10: TCGAACGCAATGGGCGCAGATTGGAAGGCCTAGCATTGAG que comprende la SEC ID nº: 6 flanqueada en 5' por los 5 nucleótidos contiguos del extremo 3' de la SEC ID nº: 7 y flanqueada en 3' por 5 nucleótidos contiguos del extremo 5' de la SEC ID nº: 8,
- SEC ID nº: 11: GTCGAACGCAATGGGCGCAGATTGGAAGGCCTAGCA que comprende la SEC ID nº: 6 flanqueada en 5' de los 6 nucleótidos contiguos del extremo 3' de la SEC ID nº: 7.

El aptámero según la invención también puede comprender una secuencia derivada de T10.1C (SEC ID nº: 4) de la misma estructura secundaria tallo-bucle-tallo-bucle apical (véase la figura 1), estando cada tallo constituido por emparejamientos G-C, C-G, A-T o T-A, comprendiendo cada bucle de 2 a 10 nucleótidos.

Esta secuencia también se puede traducir de la siguiente manera: $X_1 \dots X_n X_{(n+1)} \dots X_m X_{(m+1)} \dots X_p X_{(p+1)} \dots X_r X_{(r+1)} \dots X_o X_{(o+1)} \dots X_s X_{(s+1)} \dots X_t$ en la que cada X es un nucleótido

$$1 \leq n \leq 5$$

$$n+1 \leq m \leq n+5, \text{ preferentemente } n+1 \leq m \leq n+3$$

$$m+1 \leq p \leq m+5$$

$$p+1 \leq r \leq p+10, \text{ preferentemente } p+2 \leq r \leq p+8, \text{ de manera particularmente preferida } r=p+5$$

$$r+1 \leq o \leq r+5$$

$$o+1 \leq s \leq o+5$$

$$s+1 \leq t \leq s+5$$

$$t-s=n$$

$$o-r = p-m$$

n, m, p, r, o, s, t son unos números enteros y significan la posición del nucleótido,

los nucleótidos X_1 a X_n y $X_{(s+1)}$ a X_t son A, T, G o C, preferentemente G o C, con la condición de que estén emparejados y por lo tanto formen un tallo,

los nucleótidos $X_{(m+1)}$ a X_p y $X_{(r+1)}$ a X_o son A, T, G o C, preferentemente G o C, con la condición de que estén emparejados y por lo tanto formen un tallo,

los nucleótidos $X_{(n+1)}$ a X_m y $X_{(o+1)}$ a X_s son A, T, G o C y no se aparean y por lo tanto forman un bucle,

los nucleótidos $X_{(p+1)}$ a X_r son A, T, G o C y no se aparean y por lo tanto forman un bucle.

Se denomina "tallo" a una secuencia bicatenaria que se aparea perfectamente, por ejemplo:

G-C	A-T
C-G	A-T
G-C	A-T
C-G	A-T

Se denomina mediante "bucle" un motivo en el seno de una secuencia bicatenaria sin apareamiento.

Según un modo de realización particular de la invención, el aptámero según la invención comprende una secuencia derivada de T10.1C (SEC ID nº: 4) de la misma estructura secundaria tallo-bucle-tallo-bucle apical (véase la figura 1) estando cada tallo constituido por 3 apareamientos G-C, C-G, A-T o T-A, comprendiendo cada bucle 5 nucleótidos.

Esta secuencia SEC ID nº: 12 también se puede traducir de la siguiente manera: $X_1 \dots X_n X_{(n+1)} \dots X_m X_{(m+1)} \dots X_p X_{(p+1)} \dots X_r X_{(r+1)} \dots X_o X_{(o+1)} \dots X_s X_{(s+1)} \dots X_t$ en el que cada X es un nucleótido

$$n=3$$

$$m=n+3$$

$p=m+3$

$r=p+5$

5 $o=r+3$

$s=o+2$

10 $t=s+3$

n, m, p, r, o, s, t son unos números enteros y significan la posición del nucleótido,

los nucleótidos X_1 a X_n y $X_{(s+1)}$ a X_t son A, T, G o C, preferentemente G o C, con la condición de que estén emparejados y por lo tanto formen un tallo,

15 los nucleótidos $X_{(m+1)}$ a X_p y $X_{(r+1)}$ a X_o son A, T, G o C, preferentemente G o C, con la condición de que estén emparejados y por lo tanto formen un tallo,

20 los nucleótidos $X_{(n+1)}$ a X_m y $X_{(o+1)}$ a X_s son A, T, G o C y no se aparean y por lo tanto forman un bucle,

los nucleótidos $X_{(p+1)}$ a X_r son A, T, G o C y no se aparean y por lo tanto forman un bucle.

Se denomina "tallo" a una secuencia bicatenaria que se aparea perfectamente, por ejemplo:

G-C	A-T
C-G	A-T
G-C	A-T
C-G	A-T

25 Otro objeto de la invención se refiere a la utilización de un aptámero según la invención para inhibir la actividad enzimática de la tirosinasa.

30 La tirosinasa transforma la tirosina en L-DOPA. Se puede evaluar la actividad enzimática de la tirosinasa midiendo la aparición de DOPAcromo, producto de oxidación coloreado de la L-DOPA. La cinética de aparición de este producto de oxidación se controla midiendo la absorbancia a 450 nm.

35 Preferentemente, la invención se refiere a la utilización de un aptámero según la invención como agente despigmentante o aclarador de la piel en una composición cosmética o dermatológica.

Otro objeto de la invención se refiere a una composición cosmética o farmacéutica que comprende como principio activo por lo menos un aptámero según la invención en una cantidad suficiente para inhibir la actividad enzimática de la tirosinasa y uno o varios excipientes cosmética/farmacéuticamente aceptables.

40 Preferentemente, la composición de la invención comprende de 0,00001% a 10%, preferentemente de 0,00005 a 5%, más preferentemente de 0,001 a 1% de uno o varios aptámeros según la invención. En general, cualquier composición de la invención puede ser aplicada sobre la piel o los faneros.

45 Puede presentarse en cualquier forma galénica adaptada para una aplicación tópica.

50 La composición de la invención puede tener la forma en particular de soluciones acuosas u oleosas o de dispersiones del tipo loción o suero, de emulsiones de consistencia líquida o semilíquida del tipo de leche, obtenidas por dispersión de una fase acuosa en una fase siliconada (H/Si), de una fase grasa en una fase acuosa (emulsión aceite en agua) o, por el contrario, de una fase acuosa en una fase grasa (emulsión agua en aceite), o de suspensiones o emulsiones de consistencia blanda del tipo crema o gel acuoso o anhidros, o también de microcápsulas o micropartículas, o de dispersiones vesiculares de tipo iónico y/o no iónico o de espumas. Estas composiciones se preparan según los procedimientos habituales. Las cantidades de los diferentes constituyentes de las composiciones según la invención son las utilizadas convencionalmente en los campos considerados.

55 En el campo de la cosmética, estas composiciones constituyen, en particular, unas cremas de limpieza, de protección, de tratamiento o de cuidado para la cara, para las manos, para los pies o para el cuerpo (por ejemplo, cremas de día, cremas de noche, cremas de desmaquillado, cremas de base, cremas de protección solar), unas bases fluidas, unas leches de desmaquillado, unas leches corporales de protección o de cuidado de la piel, unas leches de protección solar, unas lociones, geles o espumas para el cuidado piel, como lociones de limpieza, lociones de protección solar, lociones de bronceado artificial, composiciones para baño, composiciones desodorantes que comprenden un agente bactericida, geles o lociones para después del afeitado, cremas depilatorias.

Las composiciones de acuerdo con la invención también pueden consistir en unas preparaciones sólidas pulverulentas o no, por ejemplo en forma de barra, de un polvo prensado, unos jabones o pastillas de limpieza. Puede presentarse también en forma de parches, de lápices, de pinceles y de aplicadores que permiten una aplicación localizada en las manchas de la cara o de las manos. Se puede usar como un producto de cuidado o como un producto de maquillaje.

Cuando la composición es una emulsión, la proporción de la fase grasa puede variar de aproximadamente 5% a 80% en peso, y preferentemente de aproximadamente 5% a 50% en peso con respecto al peso total de la composición. Los aceites, las ceras, los emulsionantes y los coemulsionantes utilizados en la composición en forma de emulsión se seleccionan de entre los utilizados convencionalmente en el campo de la cosmética. El emulsionante y el coemulsionante están presentes, en la composición, en una proporción que va de 0,3% a 30% en peso, y preferentemente de 0,5% a 20% en peso con respecto al peso total de la composición. La emulsión puede contener además unas vesículas lipídicas.

Cuando la composición es una solución o un gel oleoso, la fase grasa puede representar más del 90% del peso total de la composición.

De manera conocida, la composición cosmética o farmacéutica de la invención también puede contener unos adyuvantes habituales en el campo cosmético o farmacéutico, tales como los gelificantes hidrófilos o lipófilos, los activos hidrófilos o lipófilos, los conservantes, los antioxidantes, los disolventes, los perfumes, las cargas, los filtros, los pigmentos, los absorbentes de olores y las materias colorantes. Las cantidades de estos diferentes adyuvantes son las utilizadas convencionalmente en los campos considerados. Estos adyuvantes, dependiendo de su naturaleza, pueden ser introducidos en la fase grasa, en la fase acuosa, en las vesículas lipídicas o en las nanopartículas. Las cantidades de estos diferentes adyuvantes son las utilizadas convencionalmente en el campo cosmético o farmacéutico, y por ejemplo varían desde aproximadamente el 0,01% al 10% del peso total de la composición. Estos adyuvantes, dependiendo de su naturaleza, pueden ser introducidos en la fase grasa, en la fase acuosa y/o en las esférulas lipídicas.

Como aceites o ceras que se pueden utilizar en la invención, se pueden citar los aceites minerales (aceite de vaselina), los aceites vegetales (fracción líquida de la manteca de karité, aceite de girasol), los aceites animales (perhidroescualeno), los aceites sintéticos (Aceite de Purcellin), los aceites o ceras siliconadas (ciclometicona) y los aceites fluorados (perfluoropolíéteres), las ceras de abeja, carnauba o parafina. A estos aceites se les pueden añadir unos alcoholes grasos y unos ácidos grasos (ácido esteárico). Como emulsionantes que se pueden utilizar en la invención, se pueden citar, por ejemplo, el estearato de glicerol, el polisorbato 60 y la mezcla de PEG-6/PEG-32/estearato de glicol vendida con el nombre Tefose 63 por Gattefosse.

Como disolventes que se pueden utilizar en la invención, se pueden mencionar los alcoholes inferiores, en particular etanol y el isopropanol y el propilenglicol.

Como gelificantes hidrófilos que se pueden utilizar en la invención, se pueden mencionar los polímeros carboxivinílicos (carbómeros), los copolímeros acrílicos tales como los copolímeros de acrilatos/alquilacrilatos, las poliacrilamidas, los polisacáridos tales como la hidroxipropilcelulosa, las gomas naturales y las arcillas, y, como gelificantes lipófilos, se pueden mencionar las arcillas modificadas tales como las bentonas, las sales metálicas de ácidos grasos tales como los estearatos de aluminio, la sílice hidrófoba, la etilcelulosa y el polietileno.

Una composición de la invención también puede comprender uno o varios principios activos diferentes, por ejemplo destinados a inhibir la melanogénesis.

Dichos activos que se pueden utilizar en combinación con los aptámeros según la invención, utilizados puros o procedentes de extractos que contienen estas moléculas, son en particular los siguientes compuestos: el ácido elárgico y sus derivados; la hidroquinona; la arbutina; el resorcinol y sus derivados; la vitamina C y sus derivados; el pantotenato sulfonato y sus derivados; el ácido kójico; moléculas que interfieren directa o indirectamente con la hormona estimulante de los melanocitos alfa (α -MSH) o su receptor o la hormona adrenocorticotrópica (ACTH); los polioles tales como la glicerina, el glicol o el propilenglicol; las vitaminas; los agentes queratolíticos o descamantes tales como el ácido salicílico y sus derivados; los alfa-hidroxiácidos tales como el ácido láctico o el ácido málico, solos o injertados, los beta-hidroxiácidos; el ácido ascórbico y sus derivados; el ácido retinoico; el retinaldehído; el retinol y sus derivados tales como el palmitato, el propionato o el acetato, en preparación liposómica o no; agentes antiglicación o antioxidantes, solos o en asociación tales como el tocoferol y sus derivados, la tiotaurina, la hipotaurina, la aminoguanidina, el pirofosfato de tiamina, la piridoxamina, la lisina, la histidina, la arginina, la fenilalanina, la piridoxina, el trifosfato de adenosina; los agentes antiinflamatorios tales como el estearil glicerretinato; los agentes calmantes y sus mezclas, los filtros solares químicos o físicos tales como el metoxicinamato de octilo, el butilmetoxidibenzoilmetano, el óxido de titanio y el óxido de zinc micronizados; y los ácidos desoxirribonucleicos o nucleicos.

La presente invención se refiere asimismo a la utilización de por lo menos un aptámero según la invención para

la preparación de un medicamento destinado a ser administrado de manera simultánea, separada o espaciada en el tiempo en asociación con uno o varios ingredientes activos diferentes, por ejemplo, los activos descritos anteriormente.

5 La presente invención también se refiere a la utilización de por lo menos un aptámero según la invención en una composición cosmética o dermatológica para despigmentar o aclarar la piel, el pelo o el cabello, o retirar o atenuar las manchas pigmentarias de la piel humana.

10 La presente invención también se refiere a la utilización de por lo menos un aptámero según la invención en o para la preparación de una composición cosmética o dermatológica como inhibidor de la síntesis de las melaninas.

15 La presente invención también se refiere a la utilización de por lo menos un aptámero según la invención para modular la expresión de la tirosinasa.

La presente invención tiene también por objeto la utilización de por lo menos un aptámero según la invención, en una composición cosmética despigmentante o aclarante de la piel humana.

20 La presente invención tiene además por objeto la utilización de por lo menos un aptámero según la invención para la preparación de una composición dermatológica despigmentante o aclarante de la piel humana.

Otro objeto de la invención se refiere a la utilización cosmética de un aptámero según la invención, preferentemente para despigmentar o aclarar la piel, el pelo y/o el cabello.

25 La presente invención también se refiere a un procedimiento de tratamiento cosmético o dermatológico para controlar el exceso de pigmentación, despigmentar o aclarar la piel humana que consiste en aplicar sobre la piel una composición cosmética o dermatológica que comprende por lo menos un aptámero según la invención.

30 La presente invención también se refiere a la utilización de por lo menos un aptámero según la invención para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento por vía tópica o a la prevención de enfermedades que se traducen por la sobreexpresión de la tirosinasa.

35 Otro objeto de la invención se refiere a un aptámero según la invención para su utilización en el tratamiento o la prevención de las hiperpigmentaciones como las hiperpigmentaciones regionales por hiperactividad melanocitaria tales como los melasmas idiopáticos, las hiperpigmentaciones localizadas por hiperactividad y proliferación melanocitaria benigna, tales como las manchas pigmentarias de senescencia (lentigo seniles), las hiperpigmentaciones accidentales tales como la fotosensibilización o la hiperpigmentación cicatricial, y para el tratamiento de ciertas leucodermias tales como el vitíligo.

40 Otro objeto de la invención se refiere a un aptámero según la invención como medicamento, preferentemente destinado a aclarar o despigmentar la piel, el pelo y/o el cabello.

45 Otro objeto de la invención se refiere a un aptámero según la invención, para su utilización en el tratamiento o la prevención de las hiperpigmentaciones como las hiperpigmentaciones regionales por hiperactividad melanocitaria tales como los melasmas idiopáticos, las hiperpigmentaciones localizadas por hiperactividad y proliferación melanocitaria benigna tales como las manchas pigmentarias de senescencia (lentigo seniles), las hiperpigmentaciones accidentales tales como la fotosensibilización o la hiperpigmentación cicatricial, y para el tratamiento de ciertas leucodermias tales como el vitíligo.

50 Los aptámeros según la invención se pueden utilizar según la invención en forma vectorizada, es decir, unidos a un vector. Este tipo de vector es bien conocido por el experto en la materia. Puede tratarse, por ejemplo, de residuo colesterol, de nanopartículas.

55 Los aptámeros según la invención también se pueden utilizar según la invención en forma de dímeros de dos aptámeros o de un conjugado de varios aptámeros. La especificación también describe un procedimiento de selección de un aptámero según la invención que comprende las etapas siguientes:

- Selección en un banco de ADN de aptámeros mediante el procedimiento SELEX contra la tirosinasa,
- 60 - evaluación del potencial para inhibir la actividad enzimática de la tirosinasa de los aptámeros identificados en la etapa anterior,
- clonación y secuenciación del aptámero así seleccionado.

Ejemplo 1: Material y procedimientos de selección de los aptámeros anti-tirosinasaProteínas

5 La proteína recombinante humana TYR (tirosinasa) que contiene una etiqueta GST en N-terminal fue proporcionada por ABNOVA. La etiqueta polyhistidina-GST fue producida en el Institut Européen de Chimie et Biologie.

Oligonucleótidos y banco

10 Un banco de ADN y de los cebadores proporcionados por Sigma se purificaron por HPLC. Las secuencias cebadoras (P3) 5' GGGAGACAAGAATAAACGCTCAA (SEC ID n°: 9) y (P5) 5' GCCTGTTGTGAGCCTCTGTGCGAA (SEC ID n°: 7) se utilizaron para la amplificación del banco que contiene una ventana de 30 nucleótidos al azar. La secuencia 5' ACTGACTGACTGACTGACTA-6C3-
15 GGGAGACAAGAATAAACGCTCAA se utilizó para producir una sola cadena como se describe en la bibliografía (Williams KP, Bartel DP. PCR product with strands of unequal length. Nucleic Acids Res. 25 de octubre 1995; 23(20): 4220-1). El cebador biotinilado en 5' (P3) se utilizó para producir unos candidatos de ADN monocatenario. Unos candidatos de ADN fueron sintetizados y purificados por HPLC por Eurogentec (Tabla 1). Antes de cualquier experimento, las poblaciones y candidatos ADN se calentaron a 75°C durante 5 min, se colocaron en hielo durante 5 minutos y luego se dejaron reposar a temperatura ambiente durante por lo menos 5
20 minutos.

Selección *in vitro*

25 Antes de la selección, el banco de ADN (1 nanomol) se trató como se ha descrito anteriormente y se incubó con unos filtros (HAWP 0,45 µM, Millipore) dos veces para la primera y segunda ronda y una vez para todos los demás en tampón PBS-Mg (154 mM NaCl, 1 mM KH₂PO₄, 2,96 mM Na₂HPO₄·7H₂O, 1mM (CH₃COO) 2 Mg durante 20 minutos a temperatura ambiente. En cada ronda, se realizó una contra-selección suplementaria contra la etiqueta de polihistidina-GST. A continuación, el banco contra-seleccionado se mezcló con tirosinasa
30 (20 picomoles) durante 20 minutos y los candidatos no unidos se separaron mediante la técnica de retención sobre filtro. Después de la filtración, los candidatos unidos a la tirosinasa se eluyeron mediante incubación durante 20 minutos a 65°C en 500 µl de fenol/urea 7M, se precipitaron y se amplificaron por PCR para producir una sola cadena utilizada para la siguiente ronda de selección. Reducir la cantidad de candidatos y de diana durante la selección para alcanzar 25 y 1 picomol en la décima ronda, respectivamente, aumentó el rigor de la
35 selección. Antes de la clonación, las poblaciones de cada ronda de selección se evaluaron por su capacidad para inhibir la actividad tirosinasa.

Clonación y secuenciación

40 Las secuencias seleccionadas de las rondas 7 y 10 se clonaron usando el kit de clonación TOPO TA (Invitrogen) y se secuenciaron usando el kit de secuenciación BigDye Terminator v1.1 cycle (Applied Biosystems) según las instrucciones del fabricante.

Caracterización de los candidatos SPR (Surface Plamon Resonance)

45 Todos los experimentos se realizaron en un dispositivo BIAcore 3000 con el tampón PBS-Mg a 23°C.

Los oligonucleótidos biotinilados calentados a 75°C durante 5 minutos, colocados en hielo durante 5 minutos y puestos a continuación a temperatura ambiente durante por lo menos 5 minutos, se inmovilizaron en chips de
50 detección recubiertos con Estreptavidina (XanTec bioanalytics). Los oligonucleótidos se inyectaron a 100 nM durante 4 minutos a 5 µl/min para alcanzar 800 a 1000 RU.

La tirosinasa y la GST-His control se inyectaron a 500 nM y 1 µM a un caudal de 20 µl/min a 23°C. Las mismas inyecciones se realizaron con tampón PBS-Mg y el tampón de almacenamiento de la tirosinasa para restar los
55 efectos del tampón al sensorgrama específico.

Después de cada inyección de proteínas, la superficie funcionalizada del chip se regeneró con una mezcla de 40% de formamida, 3,6 M de urea y 30 mM de EDTA para un impulso de 1 minuto.

60 Los datos se analizaron con el software BIA eval 4.1.

Ejemplo 2: Resultados de la selección de los aptámeros anti-tirosinasa

65 El procedimiento de selección-amplificación contra la diana tirosinasa se repitió 10 veces; las rondas SELEX 7 y 10 fueron clonadas y secuenciadas. Se analizaron 41 y 74 candidatos de ADN de las rondas 7 y 10, respectivamente. La secuencia T10.1 representa el 42% de las secuencias de la ronda 10. Las otras secuencias muestran una gran diversidad. La secuencia T10.1 no estaba presente en la ronda 7.

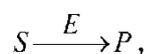
La estructura secundaria del candidato T10.1 se predijo utilizando el software mfold (Zuker, M., 2003. Nucleic Acids Res 31 (13), 3406-3415.). Se predijo un largo e imperfecto tallo-bucle que incluía parte del cebador en 5' P5 (GCCTCCTGTCGAA) y que mostraba un potencial bucle interno de 5 nucleótidos y un bucle apical de 5 nucleótidos (figura 1).

La unión de este candidato T10.1 y de las versiones truncadas derivadas del candidato de longitud completa (Tabla 1) fue buscada por Resonancia Plasmódica de Superficie (SPR). Se inmovilizaron aproximadamente 1000 RU (unidad de resonancia) del candidato T10.1 biotinilado y se inyectó la tirosinasa a 500 nM o a 1 µM. Se detectó una señal de 16 y 42 RU para 500 nM y 1 µM, respectivamente, lo cual indica una interacción entre el candidato T10.1 y la tirosinasa (figura 2).

Ejemplo 3 Medición de la actividad tirosinasa

3.1 Principio

Una enzima es una proteína capaz de catalizar específicamente la transformación de uno o dos sustratos. Tomando un modelo simplificado de reacción enzimática:



la velocidad de reacción se escribe:

$$v = \frac{d(P)}{dt} = -\frac{d(S)}{dt}.$$

Para trazar una curva ($P = f(t)$), la enzima E actúa sobre el sustrato S; el tiempo cero corresponde al desencadenamiento de la reacción. La aparición del producto P se mide en función del tiempo (véase la figura 4).

La velocidad de reacción

$$v = \frac{d(P)}{dt}$$

es constante durante las condiciones iniciales (parte de curva OA). Para esta porción de curva, la tangente en el origen se confunde con la curva: la velocidad, pendiente de la tangente OA, se denomina velocidad inicial. Luego, la velocidad disminuye (porción de curva AB) y se anula (porción BC). La velocidad se anula cuando se consume uno de los sustratos o cuando se establece un equilibrio.

Cuando se determina la velocidad de una reacción enzimática, siempre se calcula la velocidad inicial. Por lo tanto, las mediciones de velocidad se realizan en las condiciones iniciales en las que se hidroliza menos del 10% de la cantidad de sustrato. Siempre que $[S] \gg [E]$, la velocidad inicial es proporcional a la concentración de la enzima: por lo tanto, refleja la actividad de una preparación de la enzima expresada en unidades enzimáticas.

La actividad enzimática de la tirosinasa se mide mediante la detección del producto coloreado por oxidación de su producto. El producto de la tirosinasa, la L-DOPA, se oxida en un producto coloreado, DOPACromo. La cinética de aparición de este producto de oxidación sucesivo de la L-DOPA y luego de la L-DOPAQuinona se controla midiendo la absorbancia a 450 nm.

3.2 Medición de la actividad enzimática de la tirosinasa en un cultivo de melanocitos

Se inoculan unos melanocitos humanos normales en microplacas (96 pocillos) a una velocidad de $1 \cdot 10^4$ células por pocillo. Después de 72 horas de tratamiento por los diferentes candidatos de la ronda 10 y procedentes de la ronda 10 (T10.1, T.10.1A, T10.1B, T10.1C, T10.1D), se determina la actividad enzimática de la tirosinasa. Cada aptámero se prueba con 4 dosis crecientes: 4, 20, 100 y 200 nM.

Las células se enjuagan con PBS y luego se añaden 50 µl de Triton X100 (0,5%) en cada pocillo y la placa se agita durante una hora a 4°C. La reacción se inicia añadiendo 50 µl de sustrato (L-DOPA 10 mM, Sigma) en cada pocillo. La aparición del DOPACromo se mide cada 2 minutos a 450 nm durante una hora y a 37°C, con agitación regular. Las velocidades de reacción así obtenidas se expresan en unidades DO/min.

Las variaciones de la absorbancia (450 nm) a lo largo del tiempo se controlan con la ayuda de un espectrofotómetro lector de placa BMG Polarstar a +20°C. Se traza la curva que representa la absorbancia (en unidades de absorbancia) en función del tiempo (en minutos).

La velocidad inicial de la reacción se determina calculando la pendiente de la tangente original. V_0 representa la velocidad inicial en ausencia de efector y V_i esta velocidad en presencia de un efector. La relación $(V_i/V_0) \times 100$ se calcula: si esta relación es igual a 100, el efector no tiene ningún efecto sobre la actividad de la enzima; si es inferior a 100, el efector es un inhibidor de la actividad de la enzima; si es superior a 100, se trata de un activador. Los resultados de esta medición se presentan en la figura 3.

Los resultados presentados en la figura 3 demuestran un efecto inhibitor de cada uno de los candidatos ensayados sobre la actividad de la tirosinasa. Este efecto es significativo para cada una de las condiciones evaluadas, con la excepción de las concentraciones más bajas del candidato más corto, T10.1D (4 y 20 nM).

El conjunto de los candidatos que constituyen la ronda 10 tiene un efecto significativo superior al 75% en la actividad de la tirosinasa, independientemente de la concentración ensayada. No se observa ningún efecto de dosis. Se obtienen unos resultados similares para los candidatos T10.1.

Los candidatos acertados T10.1A y T10.1B son todos inhibidores asimismo de la actividad tirosinasa. Sin embargo, esta inhibición es inferior a la del candidato de tamaño completo de la ronda 10 y T10.1, en particular para las concentraciones más bajas (4 y 20 nM).

El candidato T10.1C tiene un muy buen poder inhibitor de esta enzima y aquellos, cualquiera que sea la dosis probada. En particular, se observa una inhibición de casi 95% de la actividad de la tirosinasa para este candidato cuando se utiliza a una concentración de 200 nM. Ningún otro candidato ensayado tiene una actividad tan importante a esta concentración.

El candidato más corto, T10.1D, tiene la actividad inhibitora más baja, independientemente de la dosis probada.

Estos resultados sugieren la ausencia en la estructura del aptámero T10.1D, de una región importante con actividad inhibitora frente a la tirosinasa.

Ejemplos de formulaciones

Ejemplo A: Polvo cosmético para aclarar el aclaramiento de la cara

Microcelulosa	20,00%
Lauril Sulfoacetato de Sodio	15,00%
Aptámero según la invención	1%
Perfume, colorantes, conservantes	cs.
Talco	Csp. 100%

Este polvo tiene una doble acción. Permite una limpieza de la piel y, además, permite, mediante un uso regular durante unos días, aclarar la tez. Se puede aplicar sobre la piel de la cara una o dos veces al día.

Ejemplo B: Crema cosmética de día despigmentante en forma de emulsión-gel

Glicerina	5,00%
Triglicéridos caprílico/cáprico/succínico	5,00%
Metoxicinamato de octilo	1,00%
Dimeticona copoliol	0,50%
Acrilatos/crosopolímero de acrilato de alquilo C10-30	0,50%
Aptámero según la invención	1%
Neutralizador	cs
Conservantes, perfume, colorantes	cs.
Agua	csp. 100%

Algunas personas sometidas a la radiación más o menos intensa de la luz del día, o incluso del sol directamente, quieren mantener una tez clara y evitar la aparición de manchas pigmentadas. La utilización de la emulsión-gel anterior permitirá alcanzar este objetivo. Esta composición se aplica en la cara generalmente por la mañana. Actúa tanto de manera preventiva como curativa sobre la pigmentación, regular o no, de la cara.

Ejemplo C: Composición cosmética fluida protectora de la radiación solar (SPF 30)

Pentaciclometicona volátil	49,00%
Dióxido de titanio	15,00%
Metoxicinamato de octilo	7,50%
Glicerina	5,00%
Feniltrimeticona	5,00%
Dimeticona copoliol	3,00%

Polimetilmetacrilato	2,50%
Butilo metoxidibenzoil metano	1,00%
Aptámero según la invención	1%
Neutralizador, Perfume, Conservantes, Antioxidantes	cs.
Agua	cs. 100%

Esta composición se debe utilizar antes de la exposición a la radiación solar intensa. Previene la aparición de manchas pigmentarias, en las personas predispuestas a este fenómeno. Se debe observar que la presencia de una concentración elevada de filtro solar permite compensar la disminución de la protección natural, consecuencia de la disminución de la tasa de melanina.

5

Ejemplo D: Crema dermatológica para el tratamiento de hiperpigmentaciones cutáneas de origen patológico o traumático

Estearato de glicerilo + estearato de Peg-100	5,00%
Poliisobuteno hidrogenado	4,00%
Magnesio ascorbil fosfato	3,00%
Tricaprilato/caprato de glicerol	3,00%
Escualano	3,00%
Glicerina	2,00%
Cera de abeja	1,50%
Octanoato de cetearilo	1,50%
Alcohol cetílico	1,00%
Alcohol estearílico	1,00%
Dimeticona	1,00%
Goma xantana	0,30%
Ácido etilendiaminotetraacético	0,20%
Ácido cítrico	0,10%
Citrato de sodio	0,10%
Aptámero según la invención	1%
Neutralizador, perfume, conservantes	cs.
Agua	cs. 100%

10

La utilización de esta crema permite atenuar las hiperpigmentaciones cutáneas de origen patológico o traumático. Esta crema también permite atenuar los contrastes de color en la periferia de las áreas despigmentadas en caso de vitiligo.

15 **Ejemplo E: Loción cosmética facial para aclarar la tez**

Alcohol etílico	30,00%
PPG-3 Miristiléter	5,00%
Glicerina	2,00%
Carbómero	0,20%
Polisorbato 20	0,20%
Aptámero según la invención	1%
Neutralizador, perfume, conservantes	cs.
Agua	csp. 100%

Esta loción para aclarar la tez se utiliza después de desmaquillar y limpiar la piel.

20 **Ejemplo F: Suero cosmético aclarante para la cara**

Agua	csp 100%
Glicerina	2%
EDTA tetrasódico	csp pH deseado
Ácido cítrico	
Citrato trisódico	
Goma xantana	0,25%
Poliacrilamida, isoparafina C13.14, laureth-7	0,5%
Dimeticona copoliol	0,25%
Aptámero según la invención	1%
Perfume, colorante, conservante	cs

Una gota de esta composición tan concentrada de suero, se aplica en la cara generalmente antes de la aplicación de una crema para la cara. Este suero generalmente se usa durante una o dos semanas de

tratamiento para obtener o mantener un aclaramiento de la tez.

Ejemplo G: Loción cosmética para aclarar el vello corporal

Agua	csp 100%
Alcohol	50%
Panteniletiléter	0,5%
Acetato DL- α -tocoferol	0,2%
Polisorbato 60	1%
Aptámero según la invención	1%
Perfume	0,2%
Glicerina	0,5%
Colorante	cs

5

Esta loción se aplica en las zonas velludas que se deben aclarar, en particular los brazos, durante el tiempo suficiente para obtener un aclaramiento progresivo de los pelos.

Ejemplo H: Gel crema cosmético antimanchas para las manos

10

Caprílico/cáprico succinato de diglicerilo	6%
Octanoato de octilo	2,5%
Metoxicinamato de octilo	6%
Aptámero según la invención	1%
Feniltrimeticona	2,5%
Benzofenona-3	0,5%
Hialuronato de sodio	0,05%
Goma xantana	0,2%
Acrilato/copolímero de acrilato de alquilo C10,30	0,5%
Glicerina	2%
PEG 150	3%
Neutralizantes, colorantes, perfume, conservantes	cs
Agua purificada	csp 100%

Esta crema se debe aplicar directamente sobre las manchas (lentigos solares y/o seniles) de las manos para atenuar su coloración.

15 **Listado de secuencias**

<110> INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN EN SALUD Y MÉDICA (INSERM)
L V M H INVESTIGACIÓN

20 <120> APTÁMEROS INHIBIDORES DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA TIROSINASA

<130> 364479D29495

<160> 12

25

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 77

30

<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> Aptámero

35

<400> 1

gcctgttgatg agcctcctgt cgaacgcaat gggcgcagat tggaggcct agcattgagc 60

gtttattcctt gtctccc 77

40

<210> 2
<211> 37
<212> ADN

ES 2 672 195 T3

	<213> artificial	
	<220>	
	<223> Aptámero	
5	<400> 2	
	gcctcctgtc gaacgcaatg ggcgcagatt ggaaggc	37
10	<210> 3	
	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> artificial	
15	<220>	
	<223> Aptámero	
	<400> 3	
20	ccctgtcgaa cgcaatgggc gcagattggg	30
	<210> 4	
	<211> 22	
	<212> ADN	
25	<213> artificial	
	<220>	
	<223> Aptámero	
30	<400> 4	
	cccgaacgca atgggcgcag gg	22
	<210> 5	
35	<211> 11	
	<212> ADN	
	<213> artificial	
	<220>	
40	<223> Aptámero	
	<400> 5	
	cgcaatgggc g	11
45	<210> 6	
	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> artificial	
50	<220>	
	<223> Aptámero	
	<400> 6	
55	cgcaatgggc gcagattgga aggctagca	30
	<210> 7	
	<211> 24	
60	<212> ADN	
	<213> artificial	
	<220>	
	<223> Cebador P5	
65	<400> 7	

	gcctgttg agcctcctgt cga	24
	<210> 8	
	<211> 23	
5	<212> ADN	
	<213> artificial	
	<220>	
	<223> Aptámero	
10	<400> 8	
	ttgagcg ttt attctgtct ccc	23
15	<210> 9	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> artificial	
20	<220>	
	<223> Cebador P3	
	<400> 9	
25	gggagacaag aataaacgct caa	23
	<210> 10	
	<211> 40	
	<212> ADN	
30	<213> artificial	
	<220>	
	<223> Aptámero	
35	<400> 10	
	tcgaacgca atgggcgcaga ttggaaggcc tagcattgag	40
	<210> 11	
40	<211> 36	
	<212> ADN	
	<213> artificial	
	<220>	
45	<223> Aptámero	
	<400> 11	
	gtcgaacgca atgggcgcag attggaaggc ctagca	36
50	<210> 12	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> artificial	
55	<220>	
	<223> Aptámero	
	<220>	
60	<221> stem_loop	
	<222> (1)..(22)	
	<223> tallo entre los nucleótidos 1 a 3 y 20 a 22	
	bucle entre los nucleótidos 4 a 6 y 18 a 19	
	tallo entre los nucleótidos 7 a 9 y 15 a 17	
65	bucle entre los nucleótidos 10 a 14	
	<220>	

<221> misc_feature
<222> (1)..(22)
<223> n es a, c, g, o t

5 <400> 12

nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nn

22

REIVINDICACIONES

1. Aptámero de ADN que comprende la secuencia SEC ID nº: 5 capaz de inhibir la actividad enzimática de la tirosinasa de conversión de la tirosina en L-DOPA y dopaquinona.
2. Aptámero según la reivindicación 1, capaz de unirse con fuerte afinidad a la tirosinasa.
3. Aptámero según la reivindicación 1 o 2, resistente a las nucleasas.
4. Aptámero según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en SEC ID nº: 1, SEC ID nº: 2, SEC ID nº: 3, SEC ID nº: 4 y SEC ID nº: 6.
5. Aptámero según la reivindicación 4, que comprende la secuencia SEC ID nº: 4.
6. Aptámero según la reivindicación 4, que comprende por lo menos 10 nucleótidos contiguos de la SEC ID nº: 6 flanqueada en 5' por uno o varios nucleótidos contiguos de la secuencia SEC ID nº: 7 a partir de su extremo 3' y/o flanqueada en 3' por uno o varios nucleótidos contiguos de la secuencia SEC ID nº: 8 a partir de su extremo 5'.
7. Aptámero según la reivindicación 6, que comprende la SEC ID nº: 6 flanqueada en 5' por uno o varios nucleótidos contiguos de la secuencia SEC ID nº: 7 a partir de su extremo 3' y/o flanqueada en 3' por uno o varios nucleótidos contiguos de la secuencia SEC ID nº: 8 a partir de su extremo 5'.
8. Aptámero según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende la siguiente secuencia:
- $$X_1 \text{---} X_n X_{(n+1)} \text{---} X_m X_{(m+1)} \text{---} X_p X_{(p+1)} \text{---} X_r X_{(r+1)} \text{---} X_o X_{(o+1)} \text{---} X_s X_{(s+1)} \text{---} X_t$$
- en la que cada X es un nucleótido
- $$1 \leq n \leq 5$$
- $$n+1 \leq m \leq n+5$$
- $$m+1 \leq p \leq m+5$$
- $$p+1 \leq r \leq p+10, \text{ preferentemente } p+2 \leq r \leq p+8, \text{ de manera particularmente preferida } r=p+5$$
- $$r+1 \leq o \leq r+5$$
- $$o+1 \leq s \leq o+5$$
- $$s+1 \leq t \leq s+5$$
- $$t-s=n$$
- $$o-r = p-m$$
- n, m, p, r, o, s, t son unos números enteros y significan la posición del nucleótido,
- los nucleótidos X_1 a X_n y $X_{(s+1)}$ a X_t son A, T, G o C, preferentemente G o C, con la condición de que estén emparejados y por lo tanto formen un tallo,
- los nucleótidos $X_{(m+1)}$ a X_p y $X_{(r+1)}$ a X_o son A, T, G o C, preferentemente G o C, con la condición de que estén emparejados y por lo tanto formen un tallo,
- los nucleótidos $X_{(n+1)}$ a X_m y $X_{(o+1)}$ a X_s son A, T, G o C y no se aparean y por lo tanto forman un bucle,
- los nucleótidos $X_{(p+1)}$ a X_r son A, T, G o C y no se aparean y por lo tanto forman un bucle.
9. Aptámero según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, para su utilización como inhibidor de la actividad enzimática de la tirosinasa.
10. Composición cosmética o farmacéutica que comprende como principio activo un aptámero según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 en una cantidad suficiente para inhibir la actividad enzimática de la tirosinasa y uno o varios excipientes cosméticamente/farmacéuticamente aceptables.
11. Composición según la reivindicación 10, caracterizado por que comprende de 0,00001% a 10%,

preferentemente de 0,00005% a 5%, más preferentemente de 0,001% a 1% en peso de la composición, de uno o varios aptámeros.

5 12. Utilización cosmética de un aptámero según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, preferentemente para despigmentar o aclarar la piel, el pelo y/o el cabello.

13. Aptámero según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 como medicamento.

10 14. Aptámero según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, para su utilización en el tratamiento o la prevención de hiperpigmentaciones regionales por hiperactividad melanocitaria tales como los melasmas idiopáticos, de las hiperpigmentaciones localizadas por la hiperactividad y proliferación melanocitaria benigna tales como las manchas pigmentarias de senescencia (lentigo seniles), de las hiperpigmentaciones accidentales, tales como la fotosensibilización o la hiperpigmentación cicatricial, y para el tratamiento de ciertas leucodermias tales como el vitíligo.

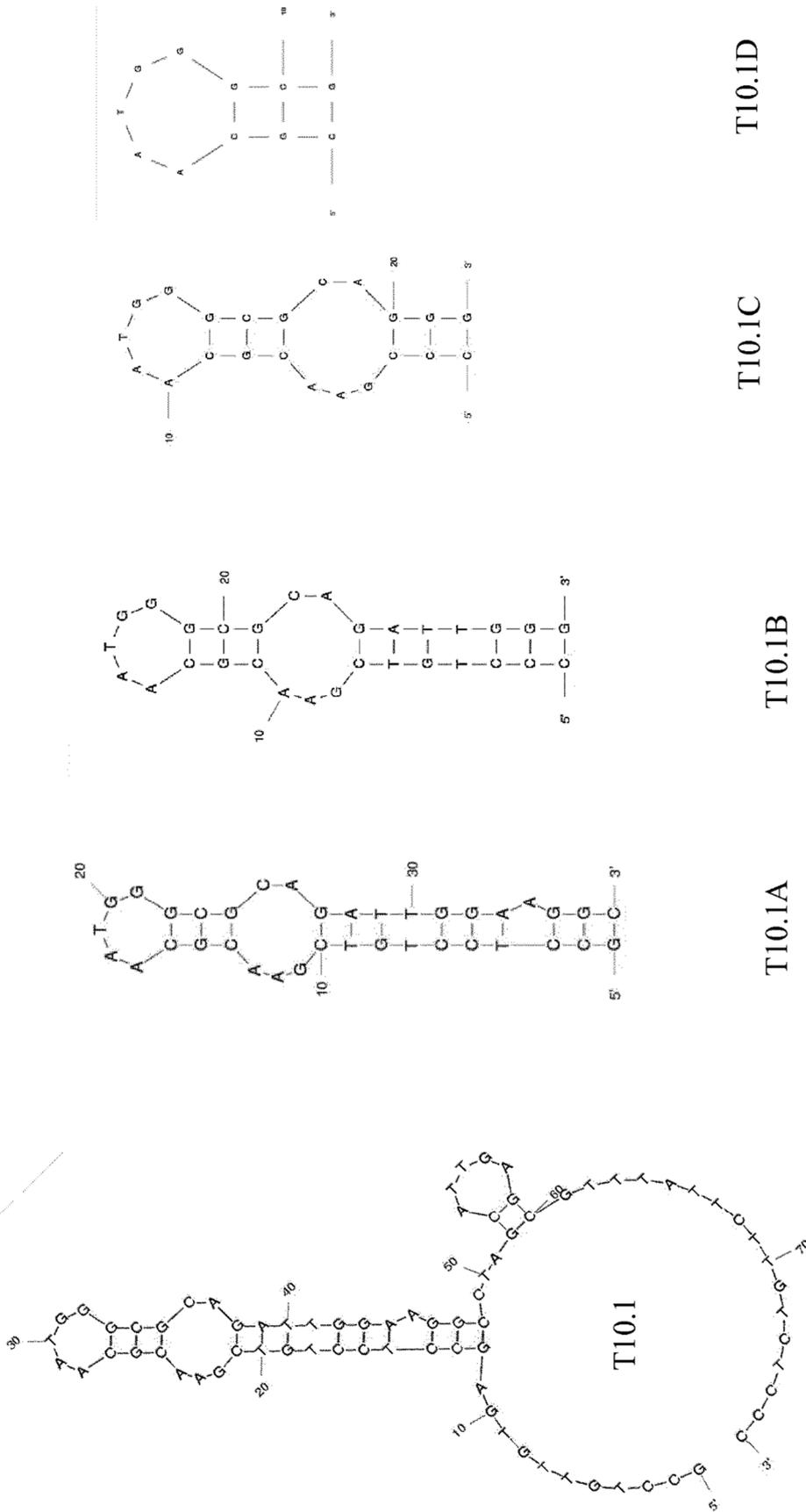


Figure 1

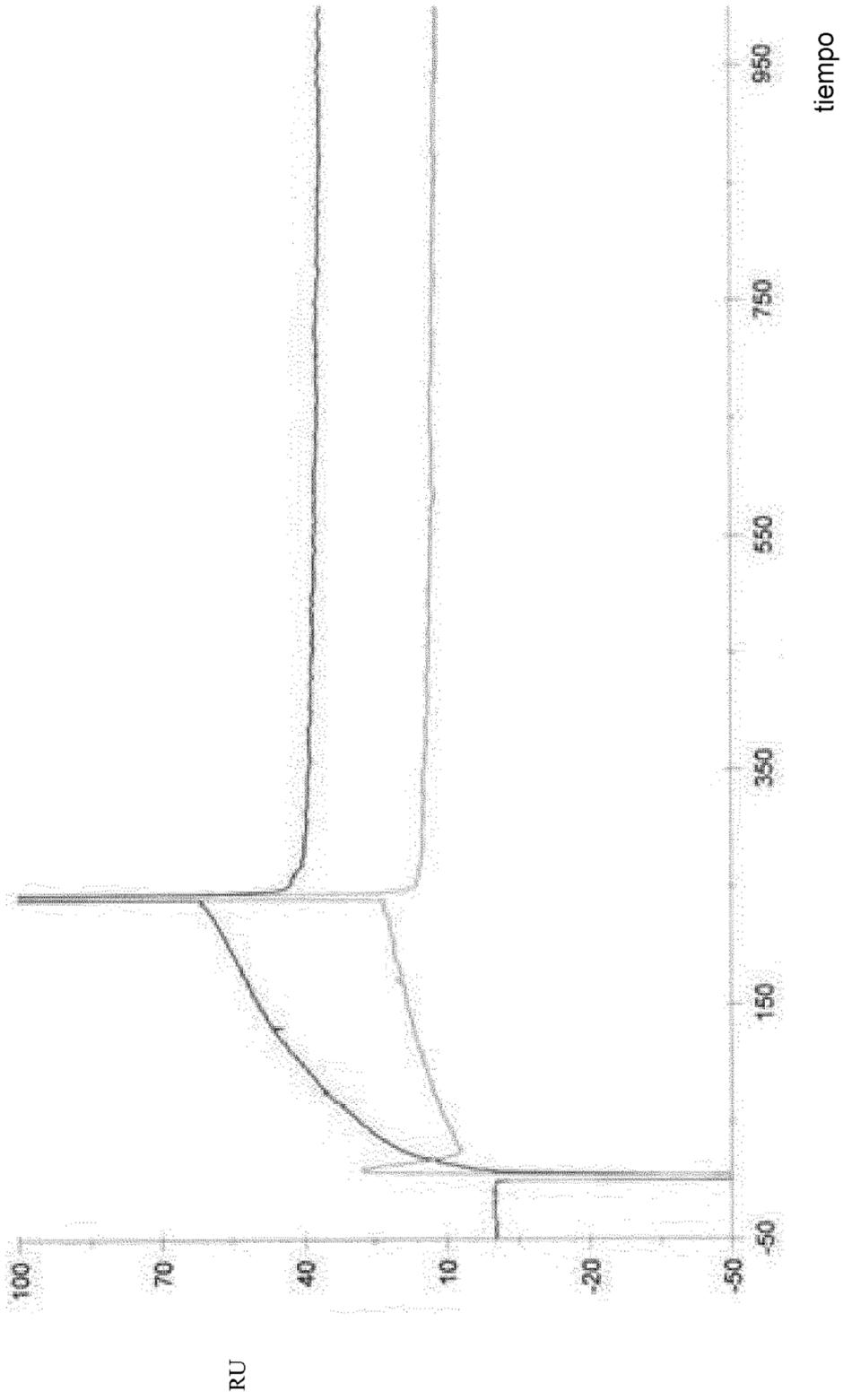


Figura 2

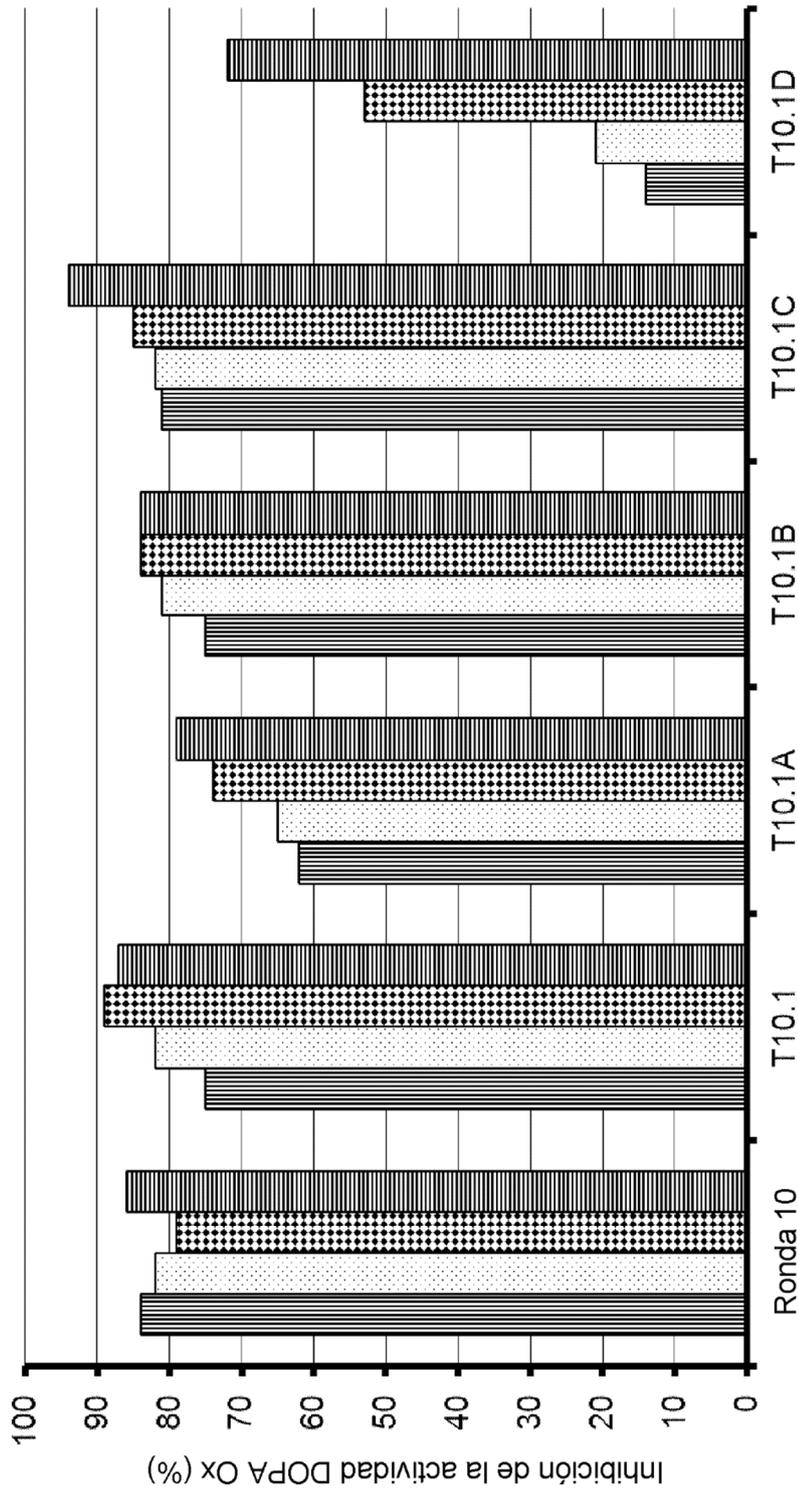


Figura 3

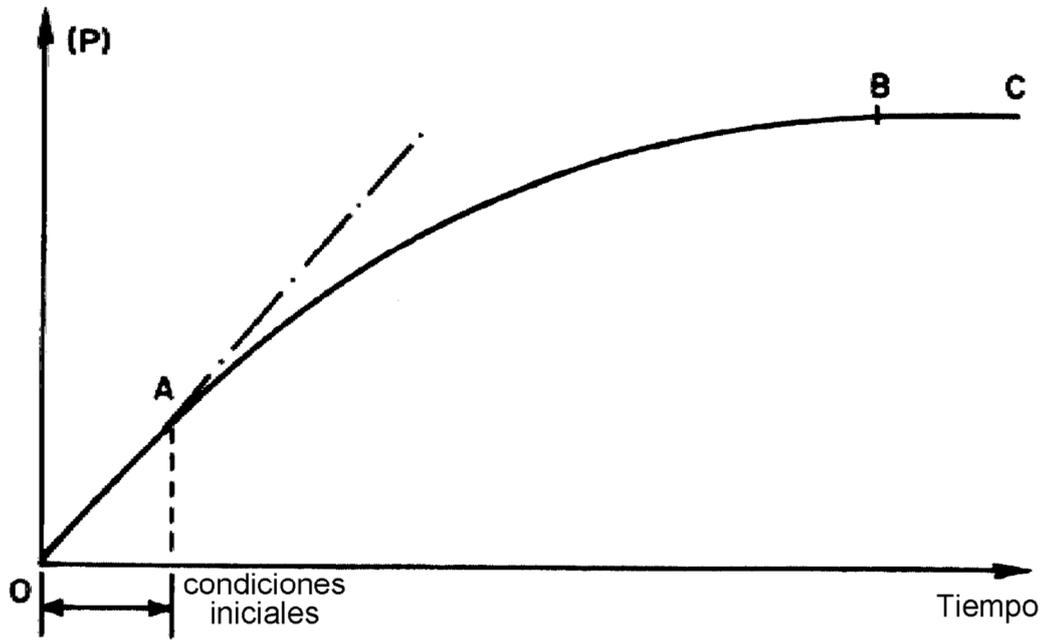


Figura 4