

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 733 288**

51 Int. Cl.:

C12N 15/115 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.12.2014 PCT/EP2014/079471**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.07.2015 WO15101637**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.12.2014 E 14824856 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.04.2019 EP 3090051**

54 Título: **Aptámeros inhibidores de la actividad enzimática de la proteína MMP-9**

30 Prioridad:

30.12.2013 FR 1363696

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

28.11.2019

73 Titular/es:

**L V M H RECHERCHE (50.0%)
185 avenue de Verdun
45800 St. Jean de Braye, FR y
INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA
RECHERCHE MEDICALE (INSERM) (50.0%)**

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

CURELL SUÑOL, S.L.P.

ES 2 733 288 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 proteína MMP-9.

- 5 La presente invención se refiere a un inhibidor novedoso de metaloproteasa de la matriz de alta especificidad, y su utilización en composiciones cosméticas o farmacéuticas, en particular como agente activo para luchar contra el envejecimiento extrínseco y/o intrínseco de la piel y/o el desarrollo del tejido adiposo, mediante la inhibición de la degradación de las matrices extracelulares epidérmica y/o dérmica y/o hipodérmica.
- 10 Las agresiones externas tales como los rayos UV, el sol, los estreses oxidativo y hídrico, térmico o incluso los agentes xenobióticos son factores implicados en el remodelado cutáneo y el proceso de envejecimiento de la piel, en particular mediante el desencadenamiento de reacciones inflamatorias mediante la liberación de citocinas que inducen la producción de metaloproteasas de la matriz (MMP).
- 15 Las MMP son unas proteasas relacionadas con la degradación y a la reconstitución de las proteínas que constituyen las matrices extracelulares. Se conocen por lo menos 11 tipos de MMP humanas. Entre las mismas se encuentran colagenasas (MMP-1, MMP-8 y MMP-13) y gelatinasas (MMP-2 y MMP-9). Las MMP son diferentes en cuanto al sustrato y al sitio de expresión.
- 20 Las gelatinasas MMP-2 y MMP-9 se conocen por descomponer los constituyentes de la membrana basal tales como el colágeno de tipo IV, V, la laminina y la elastina que desempeñan un papel importante en el mantenimiento de la estructura de la piel. La producción de estas metaloproteasas, provocada por citocinas tales como el TGF- β , conlleva la reducción y la degeneración de las matrices extracelulares, fenómenos que se consideran un factor importante de la modificación de las propiedades físicas de la piel (Inomata *et al.*, 2003, 120). La acumulación de estos daños es una de las principales causas de la formación de las arrugas, de la desaparición de la textura de la piel y de la reducción de su elasticidad.
- 25 Con el fin de prevenir la aparición de signos, visibles o no, del envejecimiento cutáneo, y atenuar su evolución, es por lo tanto importante controlar la actividad de estas metaloproteasas en la piel.
- 30 Los queratinocitos, que constituyen la epidermis expuesta a los UV y a otros factores exteriores desencadenantes de inflamación, expresan la MMP-9. Por lo tanto, se ha considerado desarrollar inhibidores específicos de la MMP-9.
- 35 Se conocen inhibidores de MMP, que presentan no obstante inconvenientes que limitan su interés y su utilización a nivel cutáneo.
- Determinados agentes quelantes tales como el EDTA y la o-fenantrolina inhiben el centro activo metálico de las MMP, pero presentan una baja especificidad y sin citotóxicos. Por lo tanto, tales agentes no pueden ser aplicados directamente sobre la piel.
- 40 Se han utilizado otros inhibidores de bajo peso molecular tales como péptidos. No obstante, han mostrado que su utilización en los productos cosméticos puede inducir efectos secundarios a nivel cutáneo (Bertin *et al.*, 2005).
- 45 También se ha utilizado el ácido retinoico como inhibidor de la MMP-9 (Lateef *et al.*, 2004), pero este compuesto presenta numerosos efectos indeseables.
- Frente a estos inconvenientes que se desprenden de la utilización de estos inhibidores, resulta particularmente interesante para la industria cosmética disponer de agentes cosméticos que se puedan utilizar en el campo antiedad, que sean a la vez eficaces sobre la diana pretendida, pero también lo suficientemente específicos como para limitar los efectos no deseados provocados por una utilización en composiciones destinadas a aplicarse sobre la piel.
- 50 Esto es tanto más importante cuanto que una piel fragilizada, tal como una piel envejecida, resulta ser particularmente sensible y propensa a reaccionar de manera negativa frente a la aplicación de dichas composiciones.
- 55 El objetivo de la presente invención es resolver los problemas e inconvenientes anteriormente mencionados de las técnicas de la técnica anterior y proponer una solución particularmente ventajosa para regular la degradación de constituyentes de la matriz extracelular, para controlar eficazmente el remodelado cutáneo, prevenir o atenuar los cambios de aspecto y las propiedades de la piel relacionados con el envejecimiento, en particular los relacionados con las agresiones externas.
- 60 A partir de Gu *et al.* (2005) se conoce la utilización de un inhibidor farmacológico de la enzima MMP-9 (SB-3CT) para tratar trastornos neurodegenerativos, pero no se menciona nada sobre aptámeros. La solicitud WO 2010/110914 A2 sugiere la utilización de un inhibidor de MMP9, por ejemplo un aptámero, para inhibir una infección
- 65

por VIH.

Gatto *et al.* (2009) y Tucker *et al.* (2012) describen las características generales de los aptámeros de estructura de G cuádruple.

La solicitud WO 2013/153138 y el artículo de Da Rochas Gomes *et al.*, (2012) describen aptámeros que se unen específicamente a la proteína MMP-9, y permiten identificar tumores mediante obtención de imágenes médicas.

Pero ninguno de estos documentos de la técnica anterior describe un aptámero de ADN según la invención ni su utilización para aplicaciones cutáneas.

Sumario de la invención

Los objetos de la invención se definen en las reivindicaciones 1 a 11.

Sumario de la descripción

La descripción se refiere a un inhibidor de la metaloproteasa 9 (MMP-9), que puede ser utilizado por vía tópica para regular la degradación de constituyentes de la matriz extracelular y por lo tanto controlar el remodelado cutáneo y/o prevenir la aparición de signos del envejecimiento cutáneo o atenuar su evolución.

Los presentes inventores han observado de manera sorprendente que un aptámero de ADN capaz de unirse específicamente a la proteína MMP-9, e inhibir cualquier actividad enzimática de dicha proteína, cumplía todos estos criterios. En particular, este aptámero, que presenta una estructura de G cuádruple, puede penetrar en las células de la piel.

Para seleccionar y aislar aptámeros inhibidores de la MMP-9, los inventores han utilizado un banco de secuencias de oligonucleótidos de fosfotriéster (igual composición que el ADN natural). Se realizó la selección de manera dirigida para identificar, aislar y caracterizar secuencias que pueden interactuar específicamente con la metaloproteasa 9 e inhibir su actividad enzimática sobre la matriz extracelular.

A continuación se sometieron a prueba estos aptámeros para determinar su capacidad para inhibir la actividad enzimática de la MMP-9, sobre sustrato sintético, sobre células y sobre un modelo de piel.

Un primer objeto de la descripción se refiere por lo tanto a un aptámero de estructura de G cuádruple, capaz de inhibir la actividad enzimática de la proteína MMP-9.

Un segundo objeto de la descripción se refiere a la utilización de un aptámero según la invención para inhibir la actividad enzimática de la proteína MMP-9.

Un tercer objeto de la descripción se refiere a una composición cosmética o farmacéutica que comprende como agente activo un aptámero según la invención en una cantidad suficiente para inhibir la actividad enzimática de la proteína MMP-9 y uno o varios excipientes cosmética o farmacéuticamente aceptables.

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

Un quinto objeto de la descripción se refiere a un aptámero según la invención como medicamento.

Un sexto objeto de la descripción se refiere a un aptámero según la invención para su utilización en el tratamiento y/o la prevención de patologías relacionadas con una sobreexpresión o con una hiperactividad de la MMP-9.

Un séptimo objeto de la descripción se refiere a un procedimiento de selección de un aptámero según la invención que comprende las siguientes etapas:

- selección en un banco de oligonucleótidos de aptámeros mediante el método SELEX frente al sitio catalítico de la proteína MMP-9,
- evaluación del potencial para inhibir la actividad enzimática de la proteína MMP-9 de los aptámeros seleccionados en la etapa anterior,
- clonación y secuenciación de los aptámeros así seleccionados.

Breve descripción de las figuras

Figura 1: secuencias de los aptámeros de ADN seleccionados frente al dominio catalítico de la MMP-9

Las secuencias de aptámeros más representadas se reunieron en grupos de secuencias según un motivo de consenso contenido en las regiones aleatorias que se representa mediante los nucleótidos encerrados en un recuadro. Las regiones comunes (es decir, regiones fijas) correspondientes a los cebadores no se representan. Los grupos de secuencias y los candidatos (es decir, referencia de los aptámeros) obtenidos en los ciclos 8 y 11 se indican a la izquierda, mientras que el número de secuencias pertenecientes a un mismo grupo se indica a la derecha. Los nucleótidos indicados en gris son propensos a contribuir a los cuartetos de G.

Figura 2: secuencias de los aptámeros de ADN acertados

Los nombres de las secuencias se indican a la izquierda. Las secuencias se han truncado con el fin de definir la región mínima necesaria para la interacción con el dominio catalítico de la proteína MMP-9.

Figura 3: análisis de homología de secuencias - cuartetos de G

Se indican en gris dobletes de G de las secuencias 11F46, 8F27, 8F14, 8F11 y 8F21 que pueden participar en la formación de cuartetos de G. Experimentos de dicróismo circular y de Tm confirmaron que las secuencias 11F46, 8F27 y 8F14 se estructuran en cuartetos de G.

Figura 4: actividad MMP-9

Este gráfico representa la inhibición de la actividad enzimática de la MMP-9 de los diferentes aptámeros seleccionados con respecto al máximo de actividad representado por un testigo de MMP-9 (barra negra).

Figuras 5 y 6: efecto-dosis sobre la actividad MMP-9

Estos gráficos representan la capacidad de inhibición de la actividad enzimática de la metaloproteasa MMP-9 de diferentes aptámeros identificados según la dosis utilizada. La dosis se indica en abscisas después del nombre del aptámero.

Descripción detallada

Un primer ejemplo de la descripción se refiere por lo tanto a un aptámero de estructura de G cuádruple, capaz de inhibir la actividad enzimática de la metaloproteasa MMP-9.

Por "aptámero" se entiende una molécula de ADN o de ARN, ligando específico y de gran afinidad de una proteína. Esta acepción comprende por consiguiente los aptámeros "naturales" y los análogos químicamente modificados.

Por "estructura de G cuádruple", "cuarteto de G" o "tétrada de G" según la invención, se entiende una estructura secundaria que comprende 4 guaninas asociadas en un plano cíclico mediante apareamientos de tipo Hoogsteen. En esta estructura, cada guanina participa en cuatro enlaces de hidrógeno por medio de los átomos N1, N7, O6 y N2 (Williamson *et al.*, 1989; Sundquist y Klug, 1989; Tucker *et al.*, 2012).

Por "actividad enzimática" con respecto a la proteína MMP-9, se entiende una actividad proteolítica que conduce a la degradación de los sustratos de matriz o bioactivos de esta proteína, tales como la gelatina que es una forma desnaturalizada de colágeno, el agregano, la entactina, la elastina, los colágenos II, III, IV, V, XIV y XVII, la mielina, la endostatina, el plasminógeno, los inhibidores de serina proteasa, la sustancia P, las proteínas CBP30 y CBP35, el receptor alfa de la interleucina 2 (IL2), el inhibidor de la vía del factor tisular (TFPI), el péptido amiloide beta, el pro-TNF alfa o incluso el TGF beta, y las quimiocinas CXC (Van den Steen *et al.*, 2002; Folgueras *et al.*, 2004; Chaussain-Miller *et al.*, 2006). La actividad enzimática de la proteína MMP-9 según la presente invención es preferentemente una actividad gelatinasa. En el contexto de la presente invención, la medición de la actividad proteolítica de la MMP-9 puede ser verificada según el método descrito a continuación en el ejemplo 3: la medición de la actividad enzimática de las MMP se basa en el principio de transferencia de energía por resonancia, RET o incluso de transferencia de energía de fluorescencia por resonancia, FRET. El sustrato está constituido por un oligopéptido que comprende un grupo fluorescente (F), donador de energía, y un grupo de extinción (Q, para "quenching"), aceptor de energía. Tras la hidrólisis, el grupo de extinción se libera, permitiendo medir el aumento de la fluorescencia. Se han desarrollado numerosos pares fluorescente/extintor para la medición de la actividad enzimática de las MMP, entre ellos el par 7-metoxicumarina-4-acetilo (Mca)/dinitrofenil-diaminopropionilo (Dnp) (Knight *et al.*, 1991; Knight *et al.*, 1992).

Los aptámeros se seleccionan mediante selección/amplificación en alternancia lo 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 de "aptámeros" dado a los oligonucleótidos que presentan el carácter deseado, procedentes de la selección. Las técnicas clásicas de ingeniería genética (clonación, secuenciación, expresión) permiten identificar individualmente estos aptámeros, caracterizarlos y a continuación producirlos en cantidad.

La selección de los aptámeros se puede realizar mediante un protocolo optimizado de selección *in vitro*, conocido

con el nombre de "SELEX" ("*Systemic Evolution of Ligands by Exponential enrichment*", evolución sistémica de ligandos mediante enriquecimiento exponencial), descrito en particular en la solicitud internacional WO 91/19813.

5 El procedimiento SELEX permite generar ligandos de afinidad y especificidad muy altas en gran cantidad. Este enfoque se basa en la puesta en contacto de la molécula diana con un banco de posibles ligandos. Un sistema de ciclos de desorción/selección permite enriquecer la población de los ligandos que interactúan de la manera más específica con la molécula diana. A continuación se aísla la población obtenida al final y se caracteriza permitiendo volver a sintetizarla a gran escala.

10 Aunque el procedimiento SELEX se ha establecido como una técnica general para seleccionar aptámeros, no obstante ni es previsible ni está normalizado para cualquier diana. Por el contrario, el procedimiento SELEX debe ser optimizado y adaptado para cada diana particular. El procedimiento SELEX no está garantizado para todas las dianas.

15 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, ya que 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.

20 Teniendo en cuenta estos factores críticos, la selección de aptámeros utilizando el procedimiento SELEX no es ni previsible ni evidente. Aunque todos los factores sean óptimos para la selección de aptámeros, el procedimiento SELEX no siempre permite obtener aptámeros viables para cada diana.

25 El banco inicial de candidatos está compuesto por secuencias de oligonucleótidos químicamente sintetizadas, que comprenden, 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 a lo largo del SELEX, en particular la amplificación mediante PCR. El tamaño de la porción variable dicta la diversidad del banco que es igual a 4^n ya que cada posición puede estar ocupada por uno de los cuatro nucleótidos A, T (o U), G o C. Para intervalos de gran tamaño, se alcanzan complejidades enormes: para $n = 50$ la diversidad teórica es de 4^{50} , es decir 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 se repite una vez. El límite experimental se encuentra alrededor de 10^{15} secuencias diferentes, es decir el de un banco en el que se representan todos los candidatos que presentan una región variable de 25 nucleótidos. Por lo tanto, si se elige manipular un banco que comprende un intervalo de 30 nucleótidos cuya diversidad teórica es de aproximadamente 10^{18} , sólo se explorará 1/1000 de las posibilidades.

35 Por otro lado, dado que las polimerasas utilizadas son propensas a error e introducen errores a una tasa del orden de 10^{-4} , contribuyen a enriquecer significativamente la diversidad de la combinación de secuencias a lo largo de todo el proceso SELEX: se modificará un candidato de cada 100 en cada ciclo de amplificación para un banco con una región aleatoria de 100 nucleótidos, conduciendo por lo tanto a la aparición de 10^{13} nuevos candidatos para el banco total.

40 La selección se realiza en cada ciclo, mediante 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 de diana/candidatos, concentración iónica, temperatura, lavado etc.) para que intervenga una competencia entre los candidatos para la fijación a la diana. De una manera general, se aumenta la rigurosidad a lo largo de los ciclos de manera que se favorece la captura de los candidatos más afines. Por otro lado, se realiza una contraselección para eliminar los candidatos que reconocen el soporte (filtro, bolasetc.).

45 Los oligonucleótidos son oligoaniones, presentando cada motivo unitario una carga a pH neutro, sitios donadores/aceptores de enlaces de hidrógeno y un heterociclo aromático (la base de nucleótido) capaz de generar interacciones de apilamiento. Estos oligómeros se repliegan tras la formación de pares de bases, para generar estructuras secundarias y terciarias tales como las estructuras de tallo-bucle (o de horquilla), pseudonodo o G cuádruple. El banco de secuencias iniciales es por lo tanto un banco de formas tridimensionales, correspondiendo cada una a una distribución de motivos, propensos a entablar interacciones electrostáticas, dar lugar a enlaces de 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 constantes de equilibrio de disociación del orden micromolar mientras que para que dianas proteicas las K_d inferiores a 10^{-9} M no resultan poco frecuentes.

50 La propiedad más notable de los aptámeros es la especificidad de las interacciones entabladas con su ligando, lo cual hace que sean agentes de primer plano para el reconocimiento de una diana.

65 Por lo tanto, preferentemente, el aptámero según la invención se une específicamente a la proteína MMP-9. Por

“unión específica” se entiende una interacción específica del aptámero con su diana, excluyendo cualquier interacción con una diana foránea que presenta una estructura diferente.

De manera adicionalmente preferida, dicho aptámero se une específicamente con una fuerte afinidad a dicha proteína MMP-9. Por “unión específica con fuerte afinidad” se entiende, en el sentido de la presente invención, una interacción específica del aptámero con su diana, con una constante de disociación (K_d) suficientemente baja como para permitir la inhibición significativa de la actividad catalítica de la enzima seleccionada como diana.

En el contexto de la presente invención, se ha utilizado el sitio catalítico aislado de la proteína MMP-9 para generar el aptámero según la invención. El experto en la materia está en condiciones de aislar y expresar dicho sitio catalítico con la ayuda de técnicas de biología molecular bien establecidas en la técnica. De manera preferida, se ha utilizado el fragmento peptídico Phe88-Pro438 de la proteína MMP-9 humana, que constituye el sitio catalítico de esta enzima, para generar el aptámero según la invención (número de registro de la proteína MMP-9 humana: P14780 según la base de datos UniProtKB/Swiss-Prot).

Los aptámeros de la descripción pueden ser oligodesoxi-(ADN) u oligorribonucleótidos (ARN). En este último caso, la primera etapa del SELEX puede consistir en una transcripción de un banco inicial de ADN, comprendiendo la parte fija en 5' de los candidatos una secuencia promotora. Tras la selección, los candidatos se convierten en ADN mediante transcripción inversa antes de ser amplificado. Se han seleccionado aptámeros de ARN y ADN que presentan características comparables frente a una misma diana. Además los dos compuestos son inhibidores competitivos uno con respecto al otro, lo que sugiere un recubrimiento de los sitios de interacción. Esto tiene consecuencias principales para la realización de aptámeros químicamente modificados.

El desarrollo del enfoque antisentido ha conducido a la síntesis de numerosos análogos de los que algunos, por ejemplo, confieren al oligómero una resistencia frente a las nucleasas, una propiedad útil para una utilización en un entorno biológico (medio de cultivo celular o *in vivo*). Modificaciones de la unión fosfodiéster, del azúcar o del esqueleto de fosfato-azúcar tales como los derivados de 2'-O-metilo, ácido nucleico “locked” (bloqueado) o boranofosfato, conducen a oligómeros resistentes a las nucleasas. Esta propiedad puede presentar un interés para los aptámeros. No obstante, tal como se mencionó anteriormente, el cambio completo de estructura química *a posteriori* de un aptámero seleccionado en forma de ARN o ADN conduce generalmente a una disminución incluso a una pérdida de las propiedades para las que se ha seleccionado. Esto no significa que no sea posible introducir modificaciones en determinadas posiciones. Pero conviene identificar las posiciones en las que se toleran las modificaciones. Esto se puede realizar mediante ensayo de variantes puntuales o mediante un enfoque sistemático denominado de interferencia química que es una variante de la cartografía por impresión.

De manera preferida, el aptámero según la invención es un aptámero de ADN.

En el contexto de la invención, se prefiere realizar directamente la selección de oligonucleótidos no naturales. Esto supone que los nucleósidos trifosfatos modificados se incorporen de manera eficaz y las matrices modificadas se lean correctamente por las polimerasas utilizadas a lo largo del SELEX. Un número muy pequeño de análogos satisfacen las exigencias. En lo que se refiere a los derivados que confieren una resistencia a las nucleasas, las posibilidades se limitan a los análogos de fosforotioato, boranofosfato, 2'-metilo, 2'-amino- o 2'-fluoro-pirimidina, siendo estos últimos con diferencia los más utilizados. Los aptámeros identificados en este caso presentan nucleósidos pirimidínicos modificados y residuos púricos no modificados (2'-hidroxilo). Estas moléculas presentan una resistencia aumentada frente a las nucleasas. Si es necesario, se pueden introducir residuos púricos modificados *a posteriori*, tal como se indicó anteriormente. Por otro lado, es posible seleccionar oligonucleótidos que comprenden 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 frente a las nucleasas, pero permite añadir nuevas funcionalidades (hidrofobicidad, fotorreactividad 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 de la isomería óptica, un aptámero en la serie L formará con su diana C un complejo que presenta las mismas características que el complejo formado por el isómero de la serie D y el enantiómero C' de la diana C. Por lo tanto, si se puede sintetizar químicamente el compuesto C', se utilizará para realizar la selección de un aptámero natural (D). Una vez identificado, este aptámero se sintetizará químicamente en la serie L. Este aptámero L será un ligando de la diana natural C.

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

A diferencia de las modificaciones de esqueleto que pueden alterar la estructura y que necesitan que se tomen precauciones antes de ser introducidas con riesgo de perder las propiedades de interacción del aptámero con su diana, es posible conjugar diferentes grupos a uno de los extremos 3' o 5' del oligonucleótido para convertirlo en

herramienta, sonda o detector sin perturbar sus características. Esta versatilidad constituye por otro lado un interés importante de los aptámeros, en particular con vistas a diagnósticos.

5 La expresión "análogo de aptámero" se entiende en este caso como una o varias de las modificaciones descritas anteriormente.

10 Según un modo preferido de la invención, el aptámero es resistente a las nucleasas. Preferentemente, el aptámero según la invención comprende por lo menos una modificación de la unión fosfodiéster, de la parte de azúcar o del esqueleto de fosfato-azúcar seleccionada de entre el grupo de los derivados de 2'-alquilo, 2'-amino y 2'-fluoro en la parte de azúcar, de los derivados de fosforotioatos, metilfosfonatos o boranofosfatos a nivel del esqueleto, o de los LNA ("Locked Nucleic Acids", ácidos nucleicos bloqueados) o PNA ("Peptide Nucleic Acids", ácidos nucleicos peptídicos).

15 Según ejemplos de la descripción, el aptámero comprende una secuencia nucleotídica seleccionada de entre el grupo que consiste en las secuencias SEC ID nº: 1 a SEC ID nº: 10, tal como se definen a continuación:

- 5'X₁X₂X₃X₄TTTGGTGGGTYTGGGGTWGYKX₅X₆3', en la que X representa 0 o 1 nucleótido G (SEC ID nº: 1) objeto de la invención;
- 20 - 5'TGGCRCGGGGTTGGTGTGTTGGT3' (SEC ID nº: 2);
- 5'GGGWTTGGCTTX₇CGGYGCCTGGCG3', en la que X representa 0 o 1 nucleótido A (SEC ID nº: 3);
- 5'GTGGTTGGX₈GSKRTRGWKGT3', en la que X representa 0 o 1 nucleótido T (SEC ID nº: 4);
- 25 - 5'GGGTGGGGGGTGG3' (SEC ID nº: 5);
- 5'TTGGTGGGATGGGGGGGGTGTTCGGCT3' (SEC ID nº: 6);
- 30 - 5'CTGGGGTGTGTGCGATTGTGTGGGTGGG3' (SEC ID nº: 7);
- 5'SCSCGGTGGAYTGGTTGGGTTTGGATCCCC3' (SEC ID nº: 8);
- 5'TGAGGGGGTGGATGGGAGGGTTCCGCACG3' (SEC ID nº: 9); y
- 35 - 5'TGGACGGTGGGTTGGGCGGGGGTGTCCA3' (SEC ID nº: 10).

40 Según un modo de realización, el aptámero según la invención comprende una secuencia nucleotídica que consiste en la secuencia consenso 5'X₁X₂X₃X₄TTTGGTGGGTYTGGGGTWGYKX₅X₆3', en la que X representa 0 o 1 nucleótido G (SEC ID nº: 1) o una de las secuencias SEC ID nº: 11 a SEC ID nº: 17, SEC ID nº: 32 a SEC ID nº: 34, y SEC ID nº: 40 a SEC ID nº: 45 comprendidas en la secuencia consenso SEC ID nº: 1.

45 Dichas secuencias son secuencias consenso según la nomenclatura IUPAC habitualmente utilizada para designar los nucleótidos (tabla 1).

Tabla 1

código de una letra de los nucleótidos	nucleótidos correspondientes
A	adenina
G	guanina
C	citocina
T	timina
U	uracilo
R	adenina o guanina (purinas)
Y	citocina o timina (pirimidina)
N	cualquier nucleótido
W	adenina o timina (débil)
S	guanina o citocina (fuerte)
M	adenina o citocina (amino)
K	guanina o timina (ceto)
B	no adenina (guanina, citocina o timina)
H	no guanina (adenina, citocina o timina)
D	no citocina (adenina, guanina o timina)
V	no timina (adenina, guanina o citocina)

El aptámero según un ejemplo de la descripción comprende una secuencia nucleotídica seleccionada de entre el grupo que consiste en las secuencias SEC ID n°: 6 a SEC ID n°: 29.

5 Según modo particular de la invención, dicha secuencia nucleotídica comprende por lo menos de 1 a 24 nucleótidos contiguos de la secuencia SEC ID n°: 30 flanqueada en su extremo 5', y/o por lo menos de 1 a 23 nucleótidos contiguos de la secuencia SEC ID n°: 31 flanqueada en su extremo 3'.

10 De manera adicionalmente preferida, dicha secuencia nucleotídica según la descripción se selecciona de entre el grupo que consiste en las secuencias: SEC ID n°: 6 a SEC ID n°: 10, SEC ID n°: 12 a SEC ID n°: 17, SEC ID n°: 19 a SEC ID n°: 20, SEC ID n°: 22 a SEC ID n°: 25, y SEC ID n°: 27 a SEC ID n°: 29, y comprende por lo menos de 1 a 24 nucleótidos contiguos de la secuencia SEC ID n°: 30 flanqueada en su extremo 5', y/o por lo menos de 1 a 23 nucleótidos contiguos de la secuencia SEC ID n°: 31 flanqueada en su extremo 3'.

15 También se pueden mencionar en la descripción, por ejemplo, las secuencias SEC ID n°: 32 a SEC ID n°: 39, y de manera preferida las secuencias SEC ID n°: 40 a SEC ID n°: 59.

20 Las secuencias particularmente preferidas según la descripción se seleccionan de las secuencias SEC ID n°: 12, SEC ID n°: 32 a SEC ID n°: 40, SEC ID n°: 46, y SEC ID n°: 48. Las secuencias particularmente preferidas según la invención se seleccionan de las secuencias SEC ID n°: 12, SEC ID n°: 32 y SEC ID n°: 40.

La siguiente tabla 2 resume estas secuencias de la descripción que se han reunido en 10 grupos principales de secuencias que presentan una fuerte homología (es decir, grupos I a X). El experto en la materia comprenderá fácilmente a partir de la siguiente tabla 2 que:

- 25
- las secuencias SEC ID n°: 11 a 17, 32 a 34, y 40 a 45 están comprendidas en la secuencia consenso SEC ID n°: 1 (grupo I), objetos de la invención;
- 30
- las secuencias SEC ID n°: 18 a 20, 35 a 37, y 46 y 47 están comprendidas en la secuencia consenso SEC ID n°: 2 (grupo II), ejemplos de la descripción;
- 35
- las secuencias SEC ID n°: 21 a 23, 38, 39, 48 y 49 están comprendidas en la secuencia consenso SEC ID n°: 3 (grupo III) ejemplos de la descripción;
 - las secuencias SEC ID n°: 24 a 27, y 50 a 52 están comprendidas en la secuencia consenso SEC ID n°: 4 (grupo IV) ejemplos de la descripción;
- 40
- las secuencias SEC ID n°: 28, 29, 53 y 54 están comprendidas en la secuencia consenso SEC ID n°: 5 (grupo V) ejemplos de la descripción;
 - la secuencia SEC ID n°: 55 está comprendida en la secuencia consenso SEC ID n°: 6 (grupo VI) ejemplos de la descripción;
- 45
- la secuencia SEC ID n°: 56 está comprendida en la secuencia consenso SEC ID n°: 7 (grupo VII) ejemplos de la descripción;
 - la secuencia SEC ID n°: 57 está comprendida en la secuencia consenso SEC ID n°: 8 (grupo VIII) ejemplos de la descripción;
- 50
- la secuencia SEC ID n°: 58 está comprendida en la secuencia consenso SEC ID n°: 9 (grupo IX) ejemplos de la descripción; y
 - la secuencia SEC ID n°: 59 está comprendida en la secuencia consenso SEC ID n°: 10 (grupo X) ejemplos de la descripción

Tabla 2

SEC ID nº:	Secuencia nucleotídica (5' a 3')	Referencia
SEC ID nº: 30	GCCTGTTGTGAGCCCTCCTGTCGAA	región fija en 5'
SEC ID nº: 31	TTGAGCGTTTATCTTGTCTCCC	
Grupo I		
SEC ID nº: 1	X ₁ X ₂ X ₃ X ₄ TTTTGGTGGGYTGGGGTWGKX ₅ X ₆	consenso I
SEC ID nº: 11	TTTTGGTGGTCTGGGGTTGCT	11F46min
SEC ID nº: 12	TGGGGTTTGGTGGGCTGGGGTTGCTGGCC	11F46R
SEC ID nº: 32	<u>ICGAATGGGGTTGGTGGGCTGGGGTTGCTGGCCITGAGC</u>	11F46A
SEC ID nº: 33	<u>TCGAATGGGGTTGGTGGGCTGGGGTTGCT</u>	11F46B
SEC ID nº: 34	<u>TTTGTGGGCTGGGGTTGCTGGCCITGAGC</u>	11F46C
SEC ID nº: 40	<u>GCCTGTTGTGAGCCCTCCTGTCGAAATGGGGTTGGTGGGCTGGGGTTGCTGGCCITGAGCGTTTATCTTGTCTCCC</u>	11F46
SEC ID nº: 13	<u>TGGGGTTTGGTGGGTTGGGGTTGCTGGCC</u>	11F76R
SEC ID nº: 41	<u>GCCTGTTGTGAGCCCTCCTGTCGAAATGGGGTTGGTGGGTTGGGGTTGCTGGCCITGAGCGTTTATCTTGTCTCCC</u>	11F76
SEC ID nº: 14	<u>TAGGGTTTGGTGGGCTGGGGTTGCTGGCC</u>	11F89R
SEC ID nº: 42	<u>GCCTGTTGTGAGCCCTCCTGTCGAAATGGGGTTGGTGGGCTGGGGTTGCTGGCCITGAGCGTTTATCTTGTCTCCC</u>	11F89
SEC ID nº: 15	<u>CCGGGTTTGGTGGGCTGGGGTAGTTGGC</u>	11F57R
SEC ID nº: 43	<u>GCCTGTTGTGAGCCCTCCTGTCGAAATGGGGTTGGTGGGCTGGGGTTGCTGGCCITGAGCGTTTATCTTGTCTCCC</u>	11F57
SEC ID nº: 16	<u>TTGGGGTTTGGTGGGCTGGGGTTGCGGGT</u>	8F68R
SEC ID nº: 44	<u>GCCTGTTGTGAGCCCTCCTGTCGAAATGGGGTTGGTGGGCTGGGGTTGCTGGCCITGAGCGTTTATCTTGTCTCCC</u>	8F68
SEC ID nº: 17	<u>CCGGGTTTGGTGGGCTGGGGTTGCTGGCCITGAGCGTTTATCTTGTCTCCC</u>	8F44R
SEC ID nº: 45	<u>GCCTGTTGTGAGCCCTCCTGTCGAAATGGGGTTGGTGGGCTGGGGTTGCTGGCCITGAGCGTTTATCTTGTCTCCC</u> ***** * **	8F44
Grupo II		
SEC ID nº: 2	TGGCRCGGGGTTGGTGYGGGTT	consenso II
SEC ID nº: 18	TATGGCACGGGGTTGGTGTGGGTT	8F14min
SEC ID nº: 19	TCGTATGGCACGGGGTTGGTGTGGGTTGG	8F14R
SEC ID nº: 35	<u>TCGAATCGTATGGCACGGGGTTGGTGTGGGTTGGTGGGTTGAGC</u>	8F14A
SEC ID nº: 36	<u>ICGAATCGTATGGCACGGGGTTGGTGTGGGTTGGTGGGTTGAGC</u>	8F14B
SEC ID nº: 37	<u>TATGGCACGGGGTTGGTGTGGGTTGGTGGGTTGAGC</u>	8F14C
SEC ID nº: 46	<u>GCCTGTTGTGAGCCCTCCTGTCGAAATCGTATGGCACGGGGTTGGTGTGGGTTGGTGGGTTTATCTTGTCTCCC</u>	8F14
SEC ID nº: 20	<u>CTGGCCGGGGTTGGTGTGGGGTTGGTT</u>	8F19R
SEC ID nº: 47	<u>GCCTGTTGTGAGCCCTCCTGTCGAAATGGGGTTGGTGTGGGTTGGTGGGTTTATCTTGTCTCCC</u> **** ***** * **	8F19
Grupo III		
SEC ID nº: 3	GGGWTTGGCTTX ₇ CGGYGCCTGGCG	consenso III
SEC ID nº: 21	CGAGGGTTTGGCTTACGGCGCCTGGCG	8F27min
SEC ID nº: 22	CCGGAGGGTTTGGCTTACGGCGCCTGGCG	8F27R
SEC ID nº: 38	<u>ICGAAACCCGAGGGTTGGCTTACGGCGCCTGGCGTTGAGC</u>	8F27A
SEC ID nº: 39	<u>CGAGGGTTTGGCTTACGGCGCCTGGCGI</u>	8F27B
SEC ID nº: 48	<u>GCCTGTTGTGAGCCCTCCTGTCGAAATCGGAGGGTTGGCTTACGGCGCCTGGCGTTTATCTTGTCTCCC</u>	8F27
SEC ID nº: 23	<u>CCGT-TGGGATTGGCTT-CGGTGCCTGGCGT</u>	8F50R

Otro objeto de la invención se refiere a la utilización de un aptámero según la invención, para inhibir la actividad enzimática de la proteína MMP-9.

5 La actividad enzimática puede ser medida según el método descrito anteriormente, en particular según el método del ejemplo 3 a continuación.

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 proteína MMP-9 y uno o varios excipientes cosmética/farmacéuticamente aceptables.

10 Preferentemente, la composición de la invención comprende del 0,000001% al 10%, preferentemente del 0,000002% al 5%, de manera adicionalmente preferida del 0,000005 al 1% en peso de la composición de uno o varios aptámeros según la invención.

15 De una manera general, cualquier composición de la invención puede ser aplicada sobre la piel.

Se puede presentar en cualquier forma galénica utilizada normalmente para una aplicación tópica sobre la piel.

20 La composición de la invención puede presentar la forma en particular de disoluciones acuosas o aceitosas o de dispersiones del tipo loción o suero, de emulsiones de consistencia líquida o semilíquida del tipo leche, obtenidas mediante dispersión de una fase acuosa en una fase de silicona (E/Si), de una fase grasa en una fase acuosa (H/E: emulsión de aceite en agua) o a la inversa (E/H: emulsión de agua en aceite), o de suspensiones o emulsiones de consistencia blanda del tipo crema o gel acuoso o anhídridos, o incluso de microcápsulas o micropartículas, o de dispersiones vesiculares de tipo iónico y/o no iónico o de espumas. Estas composiciones se preparan según los métodos habituales. Las cantidades de los diferentes constituyentes de las composiciones según la invención son las habitualmente utilizadas en los campos considerados.

25 En el campo de la cosmética, estas composiciones constituyen en particular 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 desmaquilladoras, cremas de base de maquillaje, cremas contra el sol), bases de maquillaje fluidas, leches desmaquilladoras, leches corporales de protección o de cuidado, leches contra el sol, lociones, geles o espumas para el cuidado de la piel, tales como lociones de limpieza, lociones contra el sol, lociones de bronceado artificial, composiciones para el baño, composiciones desodorantes que comprenden un agente bactericida, geles o lociones para después del afeitado, cremas depilatorias.

30 Las composiciones según la invención también pueden consistir en preparaciones sólidas pulverulentas o no, por ejemplo en forma de barra, de un polvo prensado, de jabones o de bloques de limpieza. También se puede presentar 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 utilizar como producto de cuidado o como producto de maquillaje.

35 Cuando la composición es una emulsión, la proporción de la fase grasa puede variar de aproximadamente el 5% al 80% en peso, y preferentemente de aproximadamente el 5% al 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 habitualmente en el campo cosmético. El emulsionante y el coemulsionante están presentes, en la composición, en una proporción que va del 0,3% al 30% en peso, y preferentemente del 0,5% al 20% en peso con respecto al peso total de la composición. La emulsión puede contener, además, vesículas lipídicas.

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

45 De manera conocida, la composición cosmética o farmacéutica de la invención también puede contener adyuvantes habituales en el campo cosmético o farmacéutico, tales como los gelificantes hidrófilos o lipófilos, los aditivos 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 habitualmente en los campos considerados, y, por ejemplo, varían de aproximadamente el 0,01% al 10% del peso total de la composición. Estos adyuvantes, según su naturaleza, pueden ser introducidos en la fase grasa, en la fase acuosa y/o en las esférulas lipídicas.

50 Como aceites o ceras que se pueden utilizar en la invención, se pueden mencionar los aceites minerales (aceite de vaselina), los aceites vegetales (fracción líquida de manteca de karité, aceite de girasol), los aceites sintéticos, los aceites o ceras de silicona (ciclometicona), las ceras de abeja, de carnauba o parafina. A estos aceites se les pueden añadir alcoholes grasos y ácidos grasos (ácido esteárico). Como emulsionantes que se pueden utilizar en la invención, se pueden mencionar por ejemplo el estearato de glicerol, el polisorbato 60 y la mezcla de PEG-6/PEG-32/estearato de glicol comercializada con la denominación de Tefosse 63 por la sociedad Gattefosse.

60 Como aceites o ceras que se pueden utilizar en la invención, se pueden mencionar los aceites minerales (aceite de vaselina), los aceites vegetales (fracción líquida de manteca de karité, aceite de girasol), los aceites sintéticos, los aceites o ceras de silicona (ciclometicona), las ceras de abeja, de carnauba o parafina. A estos aceites se les pueden añadir alcoholes grasos y ácidos grasos (ácido esteárico). Como emulsionantes que se pueden utilizar en la invención, se pueden mencionar por ejemplo el estearato de glicerol, el polisorbato 60 y la mezcla de PEG-6/PEG-32/estearato de glicol comercializada con la denominación de Tefosse 63 por la sociedad Gattefosse.

65 Como aceites o ceras que se pueden utilizar en la invención, se pueden mencionar los aceites minerales (aceite de vaselina), los aceites vegetales (fracción líquida de manteca de karité, aceite de girasol), los aceites sintéticos, los aceites o ceras de silicona (ciclometicona), las ceras de abeja, de carnauba o parafina. A estos aceites se les pueden añadir alcoholes grasos y ácidos grasos (ácido esteárico). Como emulsionantes que se pueden utilizar en la invención, se pueden mencionar por ejemplo el estearato de glicerol, el polisorbato 60 y la mezcla de PEG-6/PEG-32/estearato de glicol comercializada con la denominación de Tefosse 63 por la sociedad Gattefosse.

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

5 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/acrilatos de alquilo, 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 magnesio, la sílice hidrófoba, la etilcelulosa y el polietileno.

10 Una composición de la invención también puede comprender uno o varios de otros principios activos, por ejemplo destinados a prevenir o a luchar contra la aparición de signos del envejecimiento cutáneo (composición cosmética), o a prevenir y/o tratar patologías relacionadas con una sobreexpresión y/o con una hiperactividad de la MMP-9 (composición farmacéutica). Las patologías relacionadas con una sobreexpresión y/o con una hiperactividad de la
 15 MMP-9 son por ejemplo las enfermedades de la piel, preferentemente seleccionadas de las enfermedades inflamatorias de la piel tales como la psoriasis, los tumores cutáneos tales como el carcinoma basocelular, las lesiones cutáneas tales como las úlceras crónicas, las patologías de la cicatrización, las dermatitis bullosas tales como el penfigoide bulloso, las enfermedades granulomatosas no infecciosas tales como la sarcoidosis de la piel, el granuloma anular y la necrobiosis lipoidica, y las patologías cutáneas relacionadas con una exposición a los
 20 rayos solares ultravioleta tales como el melanoma. Otros ejemplos, no limitativos, de patologías relacionadas con una sobreexpresión y/o con una hiperactividad de la MMP-9 son las patologías tumorales, el asma, el enfisema pulmonar, la silicosis, la bronquiectasia, el púrpura anafilactoide, el síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA), la artritis reumatoide, la periodontitis, las enfermedades inflamatorias del intestino, el lupus nefrótico, el síndrome de Sjögren, la arteritis de células gigantes, el aneurisma, los traumatismos de los nervios periféricos, la enfermedad de Alzheimer, el síndrome de Guillain-Barré, la fibrosis quística y las meningitis.

25 Dichos principios activos que se pueden utilizar en asociación con los aptámeros según la invención para prevenir o luchar contra la aparición de los signos del envejecimiento cutáneo, utilizados puros o procedentes de extractos que contienen estas moléculas, son en particular los siguientes compuestos, sin limitación: los filtros UV (físicos o químicos), el retinol, los ésteres de retinol tales como el propionato de retinol o el palmitato de retinol, la beta-
 30 ecdisona, los agentes antioxidantes o antiinflamatorios tales como el ácido ascórbico o sus derivados tales como el ascorbil-2-glucósido o el 3-O-etil-ascorbilo, los derivados de tocoferol tales como el tocoferil-fosfato o el ascorbil-tocóferil-fosfato de potasio, el glicirricinato de dipotasio y el asiaticósido.

35 La presente invención también tiene por objeto la utilización de por lo menos un aptámero según la invención en una composición cosmética para tratar o prevenir la aparición de los signos, visibles o no, del envejecimiento cutáneo intrínseco y/o extrínseco o para ralentizar o atenuar sus efectos, en particular para controlar el remodelado cutáneo, reestructurar la epidermis, fortalecer la piel y/o prevenir o favorecer la atenuación o la resorción de las arrugas.

40 La expresión "envejecimiento cutáneo" se considera en este caso en su acepción más amplia. Está asociada a por lo menos un estado seleccionado de entre la disgregación de la estructura de los haces de fibras de colágeno, la formación de las arrugas, la desaparición de la elasticidad de la piel, la modificación de la textura de la piel y la reducción de la diferencia entre un surco y una elevación de la superficie de la piel.

45 Más particularmente, por "envejecimiento intrínseco", también conocido con el nombre de envejecimiento "normal" o cronobiológico, se entiende en este caso las modificaciones fisiológicas a nivel molecular, celular y/o tisular de un sujeto relacionadas con una senescencia programada en las que intervienen factores endógenos. Este envejecimiento intrínseco provoca en particular una ralentización de la renovación de las células de la piel, los queratinocitos, lo cual se traduce esencialmente en la aparición de alteraciones clínicas tales como la reducción
 50 del tejido adiposo subcutáneo y la aparición de arrugas finas o patas de gallo, y en cambios histopatológicos tales como un aumento del número y del grosor de las fibras elásticas, una pérdida de fibras verticales de la membrana del tejido elástico, y la presencia de grandes fibroblastos irregulares en las células de este tejido elástico.

55 Por "envejecimiento extrínseco", se entiende en este caso modificaciones fisiológicas a nivel molecular, celular y/o tisular de un sujeto relacionadas con estimulaciones externas tales como estimulaciones químicas y físicas excesivas. Las estimulaciones químicas y físicas que pueden deteriorar las funciones normales de la piel e inducir su envejecimiento incluyen en particular una exposición al sol, a la luz, a los rayos UV, el estrés así como la desnutrición. Este envejecimiento extrínseco conlleva alteraciones clínicas tales como arrugas profundas y la
 60 formación de una piel que ha perdido su firmeza, su flexibilidad y su elasticidad. Estas transformaciones se deben esencialmente a cambios histopatológicos, tales como una modificación excesiva del tejido elástico en la dermis superior y una degeneración cuantitativa y cualitativa de las fibras de colágeno.

65 Por "remodelado cutáneo", o reestructuración cutánea, se entiende la acción concertada de enzimas de degradación y de síntesis de la matriz extracelular de las células de la piel, tales como las células de la epidermis, de la dermis y/o de la hipodermis. En efecto, las enzimas de degradación de la matriz extracelular regulan a la vez la degradación de la matriz extracelular pero también su síntesis con el fin de crear un entorno apropiado que permite

la diferenciación celular, la proliferación o la migración. El aptámero según la invención permite en este caso controlar este remodelado cutáneo protegiendo las matrices extracelulares epidérmicas y/o dérmicas y/o hipodérmicas.

5 La presente invención también tiene por objeto la utilización de por lo menos un aptámero según la invención en o para la fabricación de una composición cosmética o farmacéutica como inhibidor de la MMP-9.

La presente invención también tiene por objeto la utilización de por lo menos un aptámero según la invención, en una composición cosmética anti-arrugas.

10 La presente invención tiene adicionalmente por objeto la utilización de por lo menos un aptámero según la invención para la fabricación de una composición dermatológica anti-arrugas.

15 Otro objeto de la invención se refiere a la utilización cosmética de un aptámero según la invención, preferentemente para tratar o prevenir la aparición de los signos, visibles o no, del envejecimiento cutáneo intrínseco y/o extrínseco o para ralentizar o atenuar sus efectos, en particular para controlar el remodelado cutáneo, reestructurar la epidermis, fortalecer la piel y/o prevenir o favorecer la atenuación o la resorción de las arrugas.

20 En particular, la utilización cosmética según la invención tiene como objetivo atenuar las arrugas y patas de gallo, en particular las que aparecen en la cara, el cuello, el escote o las manos.

25 La presente invención también se refiere a un procedimiento de tratamiento cosmético o dermatológico para tratar o prevenir la aparición de los signos, visibles o no, del envejecimiento cutáneo intrínseco y/o extrínseco o para ralentizar o atenuar sus efectos, en particular para controlar el remodelado cutáneo, reestructurar la epidermis, fortalecer la piel y/o prevenir o favorecer la atenuación o la resorción de las arrugas y/o limitar el desarrollo del tejido adiposo, que consiste en aplicar sobre una zona de piel afectada del cuerpo o de la cara una composición cosmética o dermatológica que comprende por lo menos un aptámero según la invención.

30 Preferentemente se aplica la composición de la invención una vez al día sobre la o las zonas de piel afectadas. Ventajosamente, se aplica la composición una primera vez y de nuevo por la noche sobre las mismas zonas.

35 La presente invención también se refiere a la utilización de por lo menos un aptámero según la invención para la fabricación de un medicamento destinado a ser administrado de manera simultánea, separada o escalonada en el tiempo en asociación con uno o varios de otros principios activos, por ejemplo los principios activos descritos anteriormente.

40 La presente invención también se refiere a la utilización de por lo menos un aptámero según la invención para la fabricación de un medicamento destinado al tratamiento y/o a la prevención de patologías relacionadas con una sobreexpresión y/o con una hiperactividad de la MMP-9, seleccionándose preferentemente dichas patologías de las descritas anteriormente. De manera adicionalmente preferida, dichas patologías son enfermedades de la piel tales como las descritas anteriormente.

45 Otro objeto de la invención se refiere a un aptámero según la invención como medicamento, preferentemente destinado al tratamiento y/o a la prevención de patologías relacionadas con una sobreexpresión y/o con una hiperactividad de la MMP-9, seleccionándose preferentemente dichas patologías de las descritas anteriormente. De manera adicionalmente preferida, dichas patologías son enfermedades de la piel tales como las descritas anteriormente.

50 Otro objeto de la invención se refiere a un aptámero según la invención para su utilización en el tratamiento y/o la prevención de patologías relacionadas con una sobreexpresión y/o con una hiperactividad de la MMP-9, seleccionándose preferentemente dichas patologías de las descritas anteriormente. De manera adicionalmente preferida, dichas patologías son enfermedades de la piel tales como las descritas anteriormente.

55 Los aptámeros según la invención se pueden utilizar en forma vectorizada, es decir unidos a un vector, o a una combinación de vectores, en particular para facilitar su penetración en las células de la piel. Este tipo de vector los conoce bien el experto en la materia. Ejemplos de tales vectores incluyen, sin limitación, los liposomas, en particular los liposomas catiónicos, los residuos hidrófobos tales como el colesterol, los dendrímeros, en particular los dendrímeros policatiónicos, las nanopartículas, las microencapsulaciones, los péptidos que penetran en las células tales como los dominios de transducción peptídicos (PTD), los agentes de condensación de los ácidos nucleicos tales como la polietilenimina (PEI) o la poli-L-lisina.

60 Los aptámeros según la invención también se pueden utilizar en forma de dímero de dos aptámeros o de un conjugado de varios aptámeros.

65 Los aptámeros según la invención también se pueden acoplar a principios activos destinados a prevenir o a luchar contra el envejecimiento cutáneo o a tratar y/o prevenir las enfermedades de la piel relacionadas con una

sobreexpresión y/o con una hiperactividad de la MMP-9, por ejemplo los principios activos descritos anteriormente.

Otro objeto de la invención se refiere a un procedimiento de selección de un aptámero según la invención que comprende las siguientes etapas:

- 5
- selección en un banco de oligonucleótidos de aptámeros mediante el método SELEX frente al sitio catalítico de la proteína MMP-9,
 - 10 - evaluación del potencial para inhibir la actividad enzimática de la proteína MMP-9 de los aptámeros identificados en la etapa anterior,
 - clonación y secuenciación de los aptámeros así seleccionados. Según un modo de realización preferido de la invención, dicho banco de aptámeros es un banco de ADN.

15 La presente invención se comprenderá mejor a la vista de los siguientes ejemplos. No obstante, el experto en la materia apreciará que la descripción anterior no es limitativa y que se pueden aportar diversas modificaciones, sustituciones, omisiones y cambios sin salirse del contexto de la invención.

20 Ejemplos

Ejemplo 1: Selección de los aptámeros anti-MMP9

1.1. Proteínas

25 El dominio catalítico de la MMP-9 humana recombinante que contiene una etiqueta de 6-His en posición C-terminal se obtuvo de Biomol^l internacional, las proteínas MMP-9 y MMP-2 de Calbiochem.

1.2. Oligonucleótidos y banco

30 Se purificó mediante HPLC un banco de ADN y de cebadores proporcionado por Sigma. Se utilizaron las secuencias de cebadores (P3) 5' GGGAGACAAGAATAAACGCTCAA 3' (SEC ID n°: 60) y (P5) 5' GCCTGTGTGAGCCTCCTGTGCGAA 3' (SEC ID n°: 30) para la amplificación del banco que contenía un intervalo de 30 nucleótidos de manera aleatoria. Se utilizó la secuencia 5' ACTGACTGACTGACTGACTA-6C3-
35 GGGAGACAAGAATAAACGCTCAA 3' (SEC ID n°: 61) para producir cadena sencilla tal como se describe en la bibliografía (Williams y Bartel, 1995). Se utilizó el cebador (P3) biotinilado en 5' para producir candidatos de ADN de cadena sencilla. Se sintetizaron candidatos de ADN y se purificaron mediante HPLC por Eurogentec (figuras 1 y 2). Antes de realizar cualquier experimento, se calentaron las poblaciones y los candidatos de ADN a 75°C durante 5 min, se colocaron sobre hielo durante 5 min y a continuación se pusieron a temperatura ambiental durante por lo menos 5 min.

40

1.3. Selección *in vitro*

45 Antes de la selección, se trató el banco de ADN (1 nanomol) y se incubó dos veces para los ciclos primero y segundo y una vez para todos los demás ciclos en tampón SP (Tris-HCl 50 mM, pH 7.4, NaCl 50 mM, KCl 100 mM, CaCl₂ 5 mM, (CH₃COO)₂Mg 1 mM) con filtros (HAWP 0,45 μM, Millipore) durante 20 min a temperatura ambiental. En cada ciclo, se realizó una contraselección complementaria frente a la etiqueta 6-His-GST. A continuación, se mezcló el banco sometido a contraselección con el dominio catalítico de la MMP-9 (20 picomoles) durante 20 min y se separaron los candidatos no unidos mediante la técnica de retención sobre filtro. Tras la filtración, se eluyeron los candidatos unidos al dominio catalítico de la MMP-9 mediante incubación durante 20 min a 65°C en 500 μl de fenol/urea 7 M, se precipitaron y se amplificaron mediante PCR para producir cadena sencilla utilizada para los siguientes ciclos de selección. Reducir la cantidad de candidatos y de diana durante la selección para alcanzar 25 y 1 picomoles en el undécimo ciclo, respectivamente, aumentó la rigurosidad de la selección. Antes de la clonación, se evaluó la evolución de las poblaciones para determinar su capacidad para inhibir la actividad MMP-9.

55

1.4. Clonación y secuenciación

Después de los 11 ciclos de selección, se clonaron las secuencias seleccionadas de los ciclos 8 y 11 utilizando el kit de clonación TOPO TA (Invitrogen) y se secuenciaron utilizando el kit de secuenciación BigDye Terminator v1.1 cycle (Applied Biosystems) según las instrucciones del fabricante.

60

1.5. Desnaturalización térmica de los aptámeros de ADN

65 Se prepararon los aptámeros de ADN en un tampón de cacodilato de sodio 20 mM, pH 7.3 a 20°C, que contenía 140 mM de cloruro de potasio, 20 mM de cloruro de sodio y 3 mM de cloruro de magnesio. Se prepararon las muestras de ADN a concentraciones finales de 3 μM o 10 μM para los candidatos de longitud completa y acortados, respectivamente. Se desnaturalizaron las muestras a 75°C durante 5 min y se colocaron sobre hielo durante 5 min

y se incubaron durante 20 min a temperatura ambiental. La desnaturalización de las muestras se realizó mediante calentamiento de 0,4°C/min de 4 a 90°C y se realizó un seguimiento de la misma a 260 y 295 nm. Se realizó un seguimiento de la desnaturalización térmica en un espectrofotómetro Uvikon conectado con un dispositivo de efecto Peltier que controla la temperatura a $\pm 0.1^\circ\text{C}$.

5

1.6. Dicroísmo circular de los aptámeros de ADN

Se realizaron espectros de CD en un espectrómetro de dicroísmo circular JASCO J-815 utilizando células de cuarzo con una longitud de paso óptico de 10 mm. Se realizaron los barridos a 23°C, con un tiempo de respuesta de 0,5 s, una velocidad de barrido de 500 nm/min y a lo largo de un intervalo de longitudes de onda de 230-320 nm. Se restó de cada espectro una línea base para la contribución a la señal del tampón.

10

Se prepararon los oligonucleótidos a 0,5 y 1 μM para los aptámeros de longitud completa y acortados, respectivamente. Se calentaron a 70°C durante 5 min en agua, se enfriaron durante 4 min a 4°C y se conservaron a temperatura ambiental durante 15 min en el tampón de cacodilato (cacodilato de sodio 20 mM, KCl 140 mM, NaCl 20 mM, MgCl 3 mM) hasta el análisis.

15

1.7. Resultados de la selección de los aptámeros anti-MMP-9

Se utilizó el método SELEX frente al dominio catalítico de la MMP-9 para identificar aptámeros de ADN que inhiben específicamente la actividad enzimática. Se realizaron once ciclos de selección *in vitro*. Antes de la clonación y la secuenciación, se evaluaron las poblaciones (comenzando por el banco en el ciclo 11) para determinar su potencial para inhibir la actividad MMP-9.

20

Basándose en estas pruebas de actividad, se clonaron y se secuenciaron las poblaciones de los ciclos 8 y 11.

25

La mayor parte de las secuencias presentan agrupaciones de G que pueden proporcionar cuartetos de G. Se clasificaron los candidatos en cinco familias principales (I, II, III, IV, V), conteniendo cada familia secuencias con un motivo de consenso (véanse los nucleótidos encerrados en un recuadro de la figura 1). Las demás secuencias (8F5, 8F9, 8F60, 8F65 y 11F2) (grupos VI a X) no tienen similitud con las familias anteriores excepto por su riqueza en G.

30

Ejemplo 2: Medición de la actividad MMP-9

2.1. Principio

35

Una enzima es una proteína capaz de catalizar específicamente la transformación de uno o dos sustratos. Tomando

un modelo simplificado de reacción enzimática: $S \xrightarrow{E} P$, la velocidad de reacción se escribe:

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

40

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.

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

45

La velocidad de reacción es constante durante las condiciones iniciales. Para esta porción de la curva, la tangente en el origen se confunde con la curva: la velocidad, pendiente de la tangente, se denomina velocidad inicial. Después la velocidad disminuye y se anula. 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 es la velocidad inicial la que se calcula. 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. Mientras que $[S] \gg [E]$, la velocidad inicial es proporcional a la concentración de la enzima: por lo tanto, traduce la actividad de una preparación de la enzima expresada en unidades enzimáticas. La unidad internacional (UI o U) representa la cantidad de enzima que cataliza la transformación de un micromol de sustrato por minuto.

55

2.2. Medición de la actividad enzimática

La medición de la actividad enzimática de las MMP se basa en el principio de la transferencia de energía por resonancia, RET o incluso de la transferencia de energía de fluorescencia por resonancia, FRET. El sustrato está constituido por un oligopéptido que comprende un grupo fluorescente (F), donador de energía, y un grupo de

60

extinción (Q, para “*quenching*”), aceptor de energía. Tras la hidrólisis, el grupo de extinción se libera, permitiendo medir el aumento de la fluorescencia.

5 Se han desarrollado numerosos pares fluorescente/extintor para la medición de la actividad enzimática de las MMP, entre ellos el par 7-metoxicumarina-4-acetilo (Mca)/dinitrofenil-diaminopropionilo (Dnp) (Knight *et al.*, 1991).

Medición de la actividad de MMP en medios condicionados

10 Tras la incubación de las células o modelos en 3D en presencia de los diferentes candidatos o controles, se extraen los medios condicionados, se centrifugan a 10000 g durante 10 min a +4°C con el fin de eliminar los residuos celulares y se ajustan a la misma concentración de proteína. El rojo de fenol contenido en el medio de cultivo se elimina mediante diafiltración con ayuda de microconcentrador Nanosep™ con una membrana que tiene un umbral de corte de 10 kDa. Se centrifugan 50 µl de medios condicionados a 14000 g durante 6 min a +4°C. Se vuelve a poner el retenido en suspensión en 50 µl de tampón Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, CaCl₂ 5 mM pH 7,5 y se centrifuga de nuevo en las mismas condiciones. Se repite esta etapa 3 veces permitiendo así eliminar totalmente el rojo de fenol.

15 Se añaden 20 µl de medios condicionados sin rojo de fenol a 170 µl de tampón Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, CaCl₂ 5 mM pH 7,5 en placa negra de 96 pocillos cuyos sitios de uniones no específicas se han bloqueado con ayuda de una disolución de albúmina sérica bovina (SAB) al 0,1% (p/v) en un tampón Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, CaCl₂ 5 mM pH 7,5. Se inicia la reacción mediante adición de 10 µl de sustrato Mca-Pro-Leu-Gly-Leu-(Dnp)-Ala-Arg-NH₂ a la concentración final de 2 µM en un volumen de reacción final de 200 µl. Se realiza un seguimiento de las variaciones de fluorescencia (longitud de onda de excitación: 326 nm, longitud de onda de emisión: 465 nm) a lo largo del tiempo con ayuda de un lector de placas de espectrofluorímetro BMG Polarstar a +20°C. Se traza la curva que representa la fluorescencia (en UFR) en función del tiempo (en minutos).

La velocidad inicial de la reacción se determina mediante el cálculo de la pendiente de la tangente en el origen. Se calcula la razón V_i/V_0 .

30 2.3. Modulación de la actividad de MMP en presencia de efector

Activación de la proMMP-9

35 La proMMP-9 se activa mediante incubación durante 18 horas a +4°C en presencia de 1 mM de ácido fenilmercuríico-acetato (APMA), preparado a la concentración de 10 mM en sosa (0,1 M).

Medición de la actividad

40 Se incubaron previamente 200 pM de MMP-9 a +20°C durante 5 minutos en ausencia o en presencia de los diferentes candidatos en un tampón Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, CaCl₂ 5 mM pH 7,5 en placa de 96 pocillos negra cuyos sitios de uniones no específicas se bloquearon con ayuda de una disolución de SAB al 0,1% (p/v) en el mismo tampón. Se inicia la reacción mediante adición de 10 µl de sustrato específico a la concentración final de 2 µM en un volumen de reacción final de 200 µl. Se realiza un seguimiento de las variaciones de fluorescencia (longitud de onda de excitación: 326 nm, longitud de onda de emisión: 465 nm) a lo largo del tiempo con ayuda de un lector de espectrofluorímetro de BMG Polarstar a +20°C. Se traza la curva que representa la fluorescencia (en UFR) en función del tiempo (en minutos). La velocidad inicial de la reacción se determina mediante el cálculo de la pendiente de la tangente en el origen. Se calcula la razón V_i/V_0 .

50 2.4. Resultados

Los resultados se representan en las figuras 4 a 6. En las figuras 5 y 6 se puede observar un efecto-dosis, indicándose la dosis en nanomolares en las abscisas después del nombre del aptámero.

Ejemplo 3: Composiciones según la presente invención

55 3.1. Ejemplo A: Polvo cosmético para el brillo de la tez de la cara

Microcelulosa	20,00%
Lauril-sulfoacetato de sodio	15,00%
Aptámero según la invención	0,01%
Perfume, colorantes, conservantes	c.s.
Talco	C.s.p. el 100%

60 Este polvo presenta una doble acción. Por un lado permite una limpieza de la piel, y por otro lado aclarar la tez mediante una utilización regular durante algunos días. Se puede aplicar sobre la piel de la cara de una a dos veces

al día.

3.2. Ejemplo B: Crema cosmética de día antiedad en forma de emulsión-gel

Glicerina	5,00%
Triglicéridos caprílico/cáprico/succínico	5,00%
Metoxicinamato de octilo	7,50%
Butil-metoxidibenzoil-metano	2,00%
Dimeticona-copolíol	0,50%
Hialuronato de sodio	0,1%
Polímero reticulado de acrilatos / acrilato de alquilo C10-30	0,50%
Aptámero según la invención	0,01%
Extracto de malva	3%
Neutralizante	c.s.
Conservantes, perfume, colorantes	c.s.
Agua	c.s.p. el 100%

5 Determinadas personas sometidas a radiación más o menos intensa de la luz del día, incluso del sol directamente, desean protegerse y evitar la elastosis solar. La utilización de la emulsión-gel del ejemplo B permite alcanzar este objetivo. Esta composición se aplica sobre la cara preferentemente por la mañana. Actúa de manera tanto preventiva como curativa sobre el fotoenvejecimiento, regular o no, de la cara.

10 3.3. Ejemplo C: Composición cosmética fluida protectora contra 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-copolíol	3,00%
Poli(metacrilato de metilo)	2,50%
Butil-metoxidibenzoil-metano	1,00%
Aptámero según la invención	0,01%
Neutralizante, perfume, conservantes, antioxidantes	c.s.
Agua	c.s.p. el 100%

15 Esta composición se debe utilizar antes de la exposición a una radiación solar intensa. Previene la aparición de las arrugas en las personas predispuestas a este fenómeno.

3.4. Ejemplo D: Crema dermatológica para el tratamiento antiedad de noche

Estearato de glicerilo + estearato de PEG-100	5,00%
Poliisobuteno hidrogenado	4,00%
Ascorbil-fosfato de magnesio	3,00%
Tricaprilato / caprato de glicerol	3,00%
Escualano	3,00%
Glicerina	3,00%
Manteca de karité	1,50%
Octanoato de cetearilo	1,50%
Ergotioneína	0,50%
Alcohol cetílico	1,00%
Alcohol estearílico	1,00%
Dimeticona	1,00%
Goma xantana	0,30%
Ácido cítrico	0,10%
Citrato de sodio	0,10%
Aptámero según la invención	0,001%
Adenosina	1,00%
Neutralizante, perfume, conservantes	c.s.
Agua	c.s.p. el 100%

20 La utilización de esta crema permite atenuar las arrugas y patas de gallo mediante la síntesis de colágeno, su acción antioxidante y la protección de la matriz extracelular. Esta crema también permite atenuar los contrastes de color cutáneo que aparecen con la edad.

3.5. Ejemplo E: Loción cosmética para la cara antiedad

Alcohol etílico	5,00%
Miristil éter de PPG-3	1,00%
Glicerina	3,00%
Carbómero	0,20%
Polisorbato 20	0,20%
Tocoferil-fosfato de sodio	0,1%
Goma de biosacárido 4	0,1%
Aptámero según la invención	0,0001%
Extracto de soja	0,50%
Poliacrilato de sodio	0,50%
Neutralizante, perfume, conservantes	c.s.
Agua	c.s.p. el 100%

- 5 Esta loción, que permite combatir el envejecimiento y la distensión cutánea, se utiliza después de desmaquillarse y limpiarse la piel.

3.6. Ejemplo F: Suero cosmético antiedad para la cara

Agua	c.s.p. el 100%
Glicerina	5,00%
EDTA de tetrasodio	c.s.p.
Ácido cítrico	pH deseado
Citrato de trisodio	
Goma xantana	0,25%
Poliacrilamida, isoparafina C13.14, lauril éter 7	0,50%
Dimeticona-copoliol	0,25%
Aptámero según la invención	1,00%
Adenosina	1,00%
Extracto de malva	3,00%
Hialuronato de sodio	0,10%
Acetato de tocoferilo	0,20%
Polisilicona 11	1,00%
Pentaciclometicona	4,00%
Perfume, colorante, conservante	c.s.

- 10 Se aplica una gota de esta composición muy concentrada de suero sobre la cara preferentemente antes de la aplicación de una crema para la cara. Este suero se utiliza preferentemente mediante curas de una a dos semanas para un rejuvenecimiento y alisado de la tez.

15 3.7. Ejemplo G: Gel de crema cosmético antiedad para las manos

Succinato de diglicerilo caprílico/cáprico	6%
Octanoato de octilo	2,5%
Metoxicinamato de octilo	6%
Aptámero según la invención	0,1%
Feniltrimeticona	2,5%
Benzofenona-3	0,5%
Nitruro de boro	1,00%
Aceite de camelia	1%
Hialuronato de sodio	0,05%
Goma xantana	0,2%
Copolímeros de acrilatos/acrilato de alquilo C10.30	0,5%
Glicerina	7%
PEG 150	3%
Neutralizantes, colorantes, perfume, conservantes	C.s.
Agua purificada	c.s.p. el 100%

Esta crema para las manos protectora frente los rayos UV permite prevenir la aparición de las arrugas y alisar la superficie cutánea.

Bibliografía

- Inomata S *et al.*, J. Invest. Dermatol., 2003, 120, 128-134.
- 5 Bertin *et al.*, Journal of Medicinal Chemistry, 2005, Vol. 48, N.º 24.
- Lateef *et al.*, American Journal of Pathology, Vol. 165, N.º 1, julio de 2004.
- Williamson *et al.*, Cell, 1989, 59(5): 871-80.
- 10 Sundquist y Klug, Nature, 1989, 342(6251): 825-9.
- Tucker *et al.*, Curr Pharm Des., 2012, 18(14):2014-26.
- 15 Folgueras *et al.*, Int. J. Dev. Biol., 2004, 48: 411 - 424.
- Chaussain-Miller *et al.*, J Dent Res., 2006, 85, 22-32.
- Knight *et al.*, Biochem J., 15 de febrero de 1991; 274 (Pt 1):45-8.
- 20 Knight *et al.*, FEBS Lett., 27 de enero de 1992; 296(3):263-6.
- Williams and Bartel, Nucleic Acids Res. 1995; (20) 4220-21).
- 25 Gu *et al.*, Journal of Neuroscience, vol. 25, n.º 27, 6 de julio de 2005, páginas 6401 - 6408.
- Gatto *et al.*, Current Medicinal Chemistry, Vol. 16, n.º 10, 1 de abril de 2009, páginas 1248-1265.
- 30 Da Rochas Gomes *et al.*, Bioconjugate Chemistry, vol. 23, n.º 11, 21 de noviembre de 2012, páginas 2192-2200.

Listado de secuencias

- 35 <110> L V M H RECHERCHE INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE (INSERM)
- <120> APTÁMEROS INHIBIDORES DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA PROTEÍNA MMP-9
- 40 <130> 366583 D29494
- <150> FR1363696
- <151> 2013-12-30
- 45 <160> 61
- <170> PatentIn versión 3.5
- 50 <210> 1
- <211> 27
- <212> ADN
- <213> artificial
- 55 <220>
- <223> secuencia consenso aptámero anti-MMP9 Grupo I
- <220>
- <221> misc_feature
- <222> (1)..(4)
- 60 <223> n representa 0 o 1 nucleótido G
- <220>
- <221> misc_feature
- <222> (26)..(27)
- 65 <223> n representa 0 o 1 nucleótido G

	<400> 1	
	nnnnnttggt gggytgggg twgyknn	27
5	<210> 2 <211> 23 <212> ADN <213> artificial	
10	<220> <223> secuencia consenso aptámero anti-MMP9 Grupo II	
	<400> 2	
15	tggcrcgggg ttggtgygg gtt	23
	<210> 3 <211> 24 <212> ADN <213> artificial	
20	<220> <223> secuencia consenso aptámero anti-MMP9 Grupo III	
25	<220> <221> misc_feature <222> (12)..(12) <223> n representa 0 o 1 nucleótido A	
30	<400> 3	
	gggwttgct tncggygcct ggcg	24
35	<210> 4 <211> 21 <212> ADN <213> artificial	
40	<220> <223> secuencia consenso aptámero anti-MMP9 Grupo IV	
	<220> <221> misc_feature <222> (9)..(9) <223> n representa 0 o 1 nucleótido T	
45	<400> 4	
	gtggtggng skrtrgwkgk t	21
50	<210> 5 <211> 14 <212> ADN <213> artificial	
55	<220> <223> secuencia consenso aptámero anti-MMP9 Grupo V	
	<400> 5	
60	gggtgggggg gtgg	14
	<210> 6 <211> 30 <212> ADN <213> artificial	
65		

ES 2 733 288 T3

	<220>	
	<223> secuencia consenso aptámero anti-MMP9 Grupo VI	
5	<400> 6	
	ttggtgggat gggggggggg ttgtcggct	30
	<210> 7	
10	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> artificial	
	<220>	
15	<223> secuencia consenso aptámero anti-MMP9 Grupo VII	
	<400> 7	
	ctgggggtgt gtygcgattg tgggggtggg	30
20	<210> 8	
	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> artificial	
25	<220>	
	<223> secuencia consenso aptámero anti-MMP9 Grupo VIII	
	<400> 8	
30	scscggtgga ytggtgggt ttggatcccc	30
	<210> 9	
	<211> 30	
35	<212> ADN	
	<213> artificial	
	<220>	
	<223> secuencia consenso aptámero anti-MMP9 Grupo IX	
40	<400> 9	
	tgaggggggt ggatgggagg gttccgcacg	30
45	<210> 10	
	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> artificial	
50	<220>	
	<223> secuencia consenso aptámero anti-MMP9 Grupo X	
	<400> 10	
55	tggacggtgg gttggggcgg ggggtgtcca	30
	<210> 11	
	<211> 21	
	<212> ADN	
60	<213> artificial	
	<220>	
	<223> aptámero 11F46min	
65	<400> 11	

	tttgggtgggt ctgggggtgc t	21
	<210> 12	
	<211> 30	
5	<212> ADN	
	<213> artificial	
	<220>	
	<223> aptámero 11F46R	
10	<400> 12	
	tggggtttgg tgggtctggg gttgctggcc	30
15	<210> 13	
	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> artificial	
20	<220>	
	<223> aptámero 11F76R	
	<400> 13	
25	tggggtttgg tgggttggg gttgctggcc	30
	<210> 14	
	<211> 30	
	<212> ADN	
30	<213> artificial	
	<220>	
	<223> aptámero 11F89R	
35	<400> 14	
	tagggtttgg tgggtctggg gttgctggcc	30
40	<210> 15	
	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> artificial	
	<220>	
45	<223> aptámero 11F57R	
	<400> 15	
50	ccggggtttg gtgggtctgg gtagtggc	30
	<210> 16	
	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> artificial	
55	<220>	
	<223> aptámero 8F68R	
	<400> 16	
60	ttggggtttg gtgggtctgg gttgctggc	30
	<210> 17	
	<211> 30	
65	<212> ADN	
	<213> artificial	

ES 2 733 288 T3

	<220>	
	<223> aptámero 8F44R	
5	<400> 17	
	gcggggtttg gtgggtctgg ggttggtgtg	30
10	<210> 18	
	<211> 25	
	<212> ADN	
	<213> artificial	
15	<220>	
	<223> aptámero 8F14min	
	<400> 18	
20	tatggcacgg ggttggtgtt gggtt	25
25	<210> 19	
	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> artificial	
30	<220>	
	<223> aptámero 8F14R	
	<400> 19	
35	tcgtatggca cggggttgg gttgggttg	30
40	<210> 20	
	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> artificial	
45	<220>	
	<223> aptámero 8F19R	
	<400> 20	
50	ctggcgcggg gttggtgtcg ggtttggtt	30
55	<210> 21	
	<211> 27	
	<212> ADN	
	<213> artificial	
60	<220>	
	<223> aptámero 8F27min	
	<400> 21	
65	cgagggtttg gcttacggcg cctggcg	27
	<210> 22	
	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> artificial	
	<220>	
	<223> aptámero 8F27R	
	<400> 22	

	ccgcgagggt ttgcttacg gcgctggcg	30
	<210> 23	
	<211> 30	
5	<212> ADN	
	<213> artificial	
	<220>	
	<223> aptámero 8F50R	
10	<400> 23	
	ccgtgggat tggctcggg gcctggcgtg	30
15	<210> 24	
	<211> 29	
	<212> ADN	
	<213> artificial	
20	<220>	
	<223> aptámero 8F11R	
	<400> 24	
25	ggtggtggt ggggtggagg ttaggtacc	29
	<210> 25	
	<211> 30	
	<212> ADN	
30	<213> artificial	
	<220>	
	<223> aptámero 8F70R	
35	<400> 25	
	mgtagtgggt gggctgtagt ggtgggacc	30
40	<210> 26	
	<211> 27	
	<212> ADN	
	<213> artificial	
	<220>	
45	<223> aptámero 8F77min	
	<400> 26	
50	gtggtgggg tatggtggt acagggt	27
	<210> 27	
	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> artificial	
55	<220>	
	<223> aptámero 8F77R	
	<400> 27	
60	gaagtgggtg gggatggtt ggtacagggt	30
	<210> 28	
	<211> 30	
65	<212> ADN	
	<213> artificial	

	<220> <223> aptámero 8F21R	
5	<400> 28 tggctggyga cctgcgggg ggggggtgg	30
10	<210> 29 <211> 30 <212> ADN <213> artificial	
15	<220> <223> aptámero 8F67R <400> 29	
20	cctgcgccgt gattagggg ggggggtgg	30
25	<210> 30 <211> 24 <212> ADN <213> artificial	
30	<220> <223> región fija 5\222 <400> 30	
35	gcctgtgtg agcctcctg cga	24
40	<210> 31 <211> 23 <212> ADN <213> artificial	
45	<220> <223> región fija 3' <400> 31	
50	ttgagcgttt attctgtct ccc	23
55	<210> 32 <211> 41 <212> ADN <213> artificial	
60	<220> <223> aptámero 11F46A <400> 32	
65	tcgaatggg tttggggg ctggggtgc tggccttgag c	41
	<210> 33 <211> 31 <212> ADN <213> artificial	
	<220> <223> aptámero 11F46B <400> 33	

	tcgaatgggg tttggtgggt ctgggggtgc t	31
	<210> 34	
	<211> 31	
5	<212> ADN	
	<213> artificial	
	<220>	
	<223> aptámero 11F46C	
10	<400> 34	
	tttgggtgggt ctgggggtgc tggccttgag c	31
15	<210> 35	
	<211> 41	
	<212> ADN	
	<213> artificial	
20	<220>	
	<223> aptámero 8F14A	
	<400> 35	
25	tcgaatcgta tggcacgggg ttggtgttg gttggtgag c	41
	<210> 36	
	<211> 33	
	<212> ADN	
30	<213> artificial	
	<220>	
	<223> aptámero 8F14B	
35	<400> 36	
	tcgaatcgta tggcacgggg ttggtgttg gtt	33
40	<210> 37	
	<211> 33	
	<212> ADN	
	<213> artificial	
	<220>	
45	<223> aptámero 8F14C	
	<400> 37	
50	tatggcacgg ggttgggtt gggttggtg agc	33
	<210> 38	
	<211> 41	
	<212> ADN	
	<213> artificial	
55	<220>	
	<223> aptámero 8F27A	
	<400> 38	
60	tcgaaccgag aggtttggc ttacggcgcc tggcgtgag c	41
	<210> 39	
	<211> 28	
65	<212> ADN	
	<213> artificial	

ES 2 733 288 T3

<220>
 <223> aptámero 8F27B
 5 <400> 39
 cgagggtttg gcttacggcg cctggcgt 28
 <210> 40
 10 <211> 77
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 15 <223> aptámero 11F46
 <400> 40
 gcctgttgag agcctcctgt cgaatggggg ttgggtgggtc tggggttgct ggccttgagc 60
 gtttattcct gtctccc 77
 20 <210> 41
 <211> 77
 <212> ADN
 <213> artificial
 25 <220>
 <223> aptámero 11F76
 <400> 41
 30 gcctgttgag agcctcctgt cgaatggggg ttgggtgggtc tggggttgct ggccttgagc 60
 gtttattcct gtctccc 77
 <210> 42
 <211> 77
 35 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> aptámero 11F89
 40 <400> 42
 gcctgttgag agcctcctgt cgaatggggg ttgggtgggtc tggggttgct ggccttgagc 60
 gtttattcct gtctccc 77
 45 <210> 43
 <211> 77
 <212> ADN
 <213> artificial
 50 <220>
 <223> aptámero 11F57
 <400> 43
 gcctgttgag agcctcctgt cgaaccgggg tttgggtgggt ctggggtagt tggccttgagc 60
 55 gtttattcct gtctccc 77
 <210> 44
 <211> 77

ES 2 733 288 T3

<212> ADN
 <213> artificial

 <220>
 5 <223> aptámero 8F68

 <400> 44

 gcctgttgagc agcctcctgt cgaattgggg tttggtgggt ctggggttgc gggtttgagc 60

 gtttattcct gtctccc 77
 10
 <210> 45
 <211> 77
 <212> ADN
 <213> artificial
 15
 <220>
 <223> aptámero 8F44

 <400> 45
 20
 gcctgttgagc agcctcctgt cgaagcgggg tttggtgggt ctggggttgt tggtttgagc 60

 gtttattcct gtctccc 77

 <210> 46
 <211> 77
 25 <212> ADN
 <213> artificial

 <220>
 <223> aptámero 8F14
 30
 <400> 46

 gcctgttgagc agcctcctgt cgaatcgtat ggcacgggggt tgggtttggg ttggttgagc 60

 gtttattcct gtctccc 77
 35
 <210> 47
 <211> 77
 <212> ADN
 <213> artificial

 <220>
 <223> aptámero 8F19
 40
 <400> 47

 gcctgttgagc agcctcctgt cgaactggcg cggggttgggt gtcggggttg gtttttgagc 60
 45
 gtttattcct gtctccc 77

 <210> 48
 <211> 77
 <212> ADN
 50 <213> artificial

 <220>
 <223> aptámero 8F27
 55
 <400> 48

ES 2 733 288 T3

gcctgttg agcctcctgt cgaaccgcga gggttggct tacggcct ggcgttgagc 60
gtttattcct gtctccc 77

<210> 49
<211> 77
5 <212> ADN
<213> artificial

<220>
10 <223> aptámero 8F50

<400> 49

gcctgttg agcctcctgt cgaaccgttg ggattggctt cggcctgg cgtgttgagc 60
gtttattcct gtctccc 77

15 <210> 50
<211> 77
<212> ADN
<213> artificial

20 <220>
<223> aptámero 8F11

<400> 50

gcctgttg agcctcctgt cgaatgggtg ttggggggg ggaggtagg taccttgagc 60
25 gtttattcct gtctccc 77

<210> 51
<211> 77
30 <212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> aptámero 8F70

35 <400> 51

gcctgttg agcctcctgt cgaamgtagt ggtgggctg tagtggttg gacctgagc 60
gtttattcct gtctccc 77

<210> 52
40 <211> 77
<212> ADN
<213> artificial

<220>
45 <223> aptámero 8F77

<400> 52

gcctgttg agcctcctgt cgaagaagtg gttggggtat gttggtaca ggtttgagc 60
50 gtttattcct gtctccc 77

<210> 53
<211> 77
<212> ADN
55 <213> artificial

<220>

ES 2 733 288 T3

<223> aptámero 8F21
 <400> 53
 gcctgttgag agcctcctgt cgaatggctg gygacctgac gggggggggg gtggttgagc 60
 5 gtttattcct gtctccc 77
 <210> 54
 <211> 77
 <212> ADN
 10 <213> artificial
 <220>
 <223> aptámero 8F67
 15 <400> 54
 gcctgttgag agcctcctgt cgaacctgag ccgtgattag gggggggggg gtggttgagc 60
 gtttattcct gtctccc 77
 <210> 55
 20 <211> 77
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 25 <223> aptámero 8F5
 <400> 55
 gcctgttgag agcctcctgt cgaattggag ggatgggggg ggggttggtc ggctttgagc 60
 gtttattcct gtctccc 77
 30 <210> 56
 <211> 77
 <212> ADN
 <213> artificial
 35 <220>
 <223> aptámero 8F9
 <400> 56
 40 gcctgttgag agcctcctgt cgaactgggg gtgtgtygag attgtgtggg tgggttgagc 60
 gtttattcct gtctccc 77
 <210> 57
 <211> 77
 45 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> aptámero 8F60
 50 <400> 57
 gcctgttgag agcctcctgt cgaascscgg tggaytggtt gggtttgat ccccttgagc 60
 gtttattcct gtctccc 77
 55 <210> 58
 <211> 77

ES 2 733 288 T3

<212> ADN
 <213> artificial

 <220>
 5 <223> aptámero 8F65

 <400> 58

 gcctgttgtg agcctcctgt cgaatgaggg gggggtgatgg gagggttccg cacgttgagc 60

 gtttattcctt gtctccc 77
 10
 <210> 59
 <211> 77
 <212> ADN
 <213> artificial
 15
 <220>
 <223> aptámero 11F2

 <400> 59
 20
 gcctgttgtg agcctcctgt cgaatggacg gtgggttggg gcgggggggtg tccattgagc 60

 gtttattcctt gtctccc 77

 <210> 60
 <211> 23
 25 <212> ADN
 <213> artificial

 <220>
 <223> cebador P3
 30
 <400> 60

 gggagacaag aataaacgct caa 23
 35
 <210> 61
 <211> 44
 <212> ADN
 <213> artificial
 40
 <220>
 <223> cebador P5

 <400> 61
 45 actgactgac tgactgacta cgggagacaa gaataaacgc tcaa 44

REIVINDICACIONES

- 5 1. Aptámero de estructura de G cuádruple, capaz de inhibir la actividad enzimática de la proteína MMP-9, caracterizado por que se trata de un aptámero de ADN que comprende por lo menos una secuencia nucleotídica seleccionada de entre el grupo que consiste en la secuencia consenso 5'X₁X₂X₃X₄TTTGGTGGGTYTGGGGTWGYKX₅X₆3', en la que X representa 0 o 1 nucleótido G (SEC ID n°: 1) o una de las secuencias nucleotídicas SEC ID n°: 11 a SEC ID n°: 17, SEC ID n°: 32 a SEC ID n°: 34, y SEC ID n°: 40 a SEC ID n°: 45 comprendidas en la SEC ID n°: 1.
- 10 2. Aptámero según la reivindicación 1, resistente a las nucleasas.
3. Aptámero según la reivindicación 1 o 2, caracterizado por que dicha secuencia nucleotídica comprende por lo menos de 1 a 24 nucleótidos contiguos de la secuencia SEC ID n°: 30 flanqueada en su extremo 5', y/o por lo menos de 1 a 23 nucleótidos contiguos de la secuencia SEC ID n°: 31 flanqueada en su extremo 3'.
- 15 4. Aptámero según una de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que dicha secuencia nucleotídica se selecciona de entre el grupo que consiste en las secuencias SEC ID n°: 12, SEC ID n°: 32 y SEC ID n°: 40.
- 20 5. Composición cosmética o farmacéutica que comprende como principio activo un aptámero según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en una cantidad suficiente para inhibir la actividad enzimática de la proteína MMP-9 y uno o varios excipientes cosmética o farmacéuticamente aceptables.
- 25 6. Composición según la reivindicación 5, caracterizada por que comprende del 0,000001% al 10%, preferentemente del 0,000002 al 5%, de manera más preferida del 0,000005 al 1% en peso de la composición de uno o varios aptámeros según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
- 30 7. Utilización cosmética de un aptámero según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, para tratar o prevenir la aparición de los signos, visibles o no, del envejecimiento cutáneo intrínseco y/o extrínseco o para ralentizar o atenuar sus efectos, preferentemente para controlar el remodelado cutáneo, reestructurar la epidermis, fortalecer la piel, y/o prevenir o favorecer la atenuación o la resorción de las arrugas.
8. Aptámero según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, como medicamento.
- 35 9. Aptámero según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y 8, para su utilización en el tratamiento y/o la prevención de patologías seleccionadas de entre el grupo que consiste en enfermedades de la piel seleccionadas preferentemente de entre las enfermedades inflamatorias de la piel tales como la psoriasis, los tumores cutáneos tales como el carcinoma basocelular, las lesiones cutáneas tales como las úlceras crónicas, las patologías de la cicatrización, las dermatitis bullosas tales como el penfigoide bulloso, las enfermedades granulomatosas no infecciosas tales como la sarcoidosis de la piel, el granuloma anular y la necrobiosis lipóidica, y los daños de la piel relacionados con los rayos ultravioleta.
- 40 10. Aptámero según una de las reivindicaciones 1 a 4 y 8, para su utilización en el tratamiento y/o la prevención de patologías seleccionadas de entre el grupo que consiste en las patologías tumorales, el asma, el enfisema pulmonar, la silicosis, la bronquiectasia, el púrpura anafilactoide, el síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA), la artritis reumatoide, la periodontitis, las enfermedades intestinales inflamatorias, el lupus nefrótico, el síndrome de Sjögren, la arteritis de células gigantes, el aneurisma, los traumatismos de los nervios periféricos, la enfermedad de Alzheimer, el síndrome de Guillain-Barré, la fibrosis quística y las meningitis.
- 50 11. Procedimiento de selección de un aptámero según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 que comprende las etapas siguientes:
- selección en un banco de oligonucleótidos de aptámeros mediante el método SELEX contra el sitio catalítico de la proteína MMP-9,
 - 55 - evaluación del potencial para inhibir la actividad enzimática de la proteína MMP-9 de los aptámeros identificados en la etapa anterior,
 - clonación y secuenciación de los aptámeros así seleccionados.

I	11F46	T G G G G T T T G G T G G G T C T G G G G T T G C T G G C C	10
II	8F27	C C G C G A G G G T T T G G C T T A C G G C G C C T G G C G	3
III	8F14	T C G T A T G G C A C G G G G T T G G T G T T G G G T T G G	2
IV	8F11	T G G T G G T T G G T G G G G T G G A G G T T A G G T A C C	3
V	8F21	T G G C T G G Y G A C C T T G C C G G G T G G G G G G T G G	2
VI	8F5	T T G G T G G G A T G G G G G G G G G T T G T T C G G C T	1
VII	8F9	C T G G G G T G T G T Y G C G A T T G T G T G G G T G G G	1
VIII	8F60	S C S C G G T G G A Y T G G T T G G G T T C C C C C	1
IX	8F65	T G A G G G G G T G G A T G G G A G G G T T C C G C A C G	1
X	11F2	T G G A C G G T G G G T T G G G G C G G G G G T G T C C A	1

Figura 1

```

11F46      T G G G G G T T T T G G T G G G T T G C T G G C C
11F46A    T C G A A T G G G G T T T T G G G T T G C C T T G A G C
11F46B    T C G A A T G G G G T T T T G G G T T G C C T T G A G C
11F46C      T T T T G G T G G G T C T G G G T T G C T G G C C T T G A G C

8F14A    T C G A A T C G T A T G G C A C G G G G T T G G T G T T G G T T G A G C
8F14B    T C G A A T C G T A T G G C A C G G G G T T G G T G T T G G G T T
8F14C      T A T G G C A C G G G T T G G T G T T G G G T T G G T T G A G C

8F27A    T C G A A C C G C G A G G G T T T G G C T T A C G G C C C T G G C G T T G A G C
8F27B      C G A G G G T T T G G C T T A C G G C C C T G G C G T

```

Figura 2

I	11F46	T G G G G T T T G G T	G G G T C T G G G G G T T G C T G G C C
II	8F27	C C G C G A G G G T T T G G C T T A C G G C G C C T G G C G	
III	8F14	T C G T A T G G C A C G G G T T G G T G T T G G T T G G	
IV	8F11	T G G T G G T T G G T	G G G T G G A G G T T A G G T A C C
V	8F21	T G G C T G G Y G A C C T T G C G G T G G G G G T G G	
VI	8F5	T T G G T G G G A T G G G G G G G G T T G T T C G G C T	
VII	8F9	C T G G G G T G T G T Y G C G A T T G T G G T G G T G G G	
VIII	8F60	S C S C G G T G G A Y T G G T T G G T T G G A T C C C C C	
IX	8F65	T G A G G G G G T G G A T G G G A G G G T T C C G C A C G	
X	11F2	T G G A C G G T G G G T T G G G G C G G G G G T G T C C A	

Figura 3

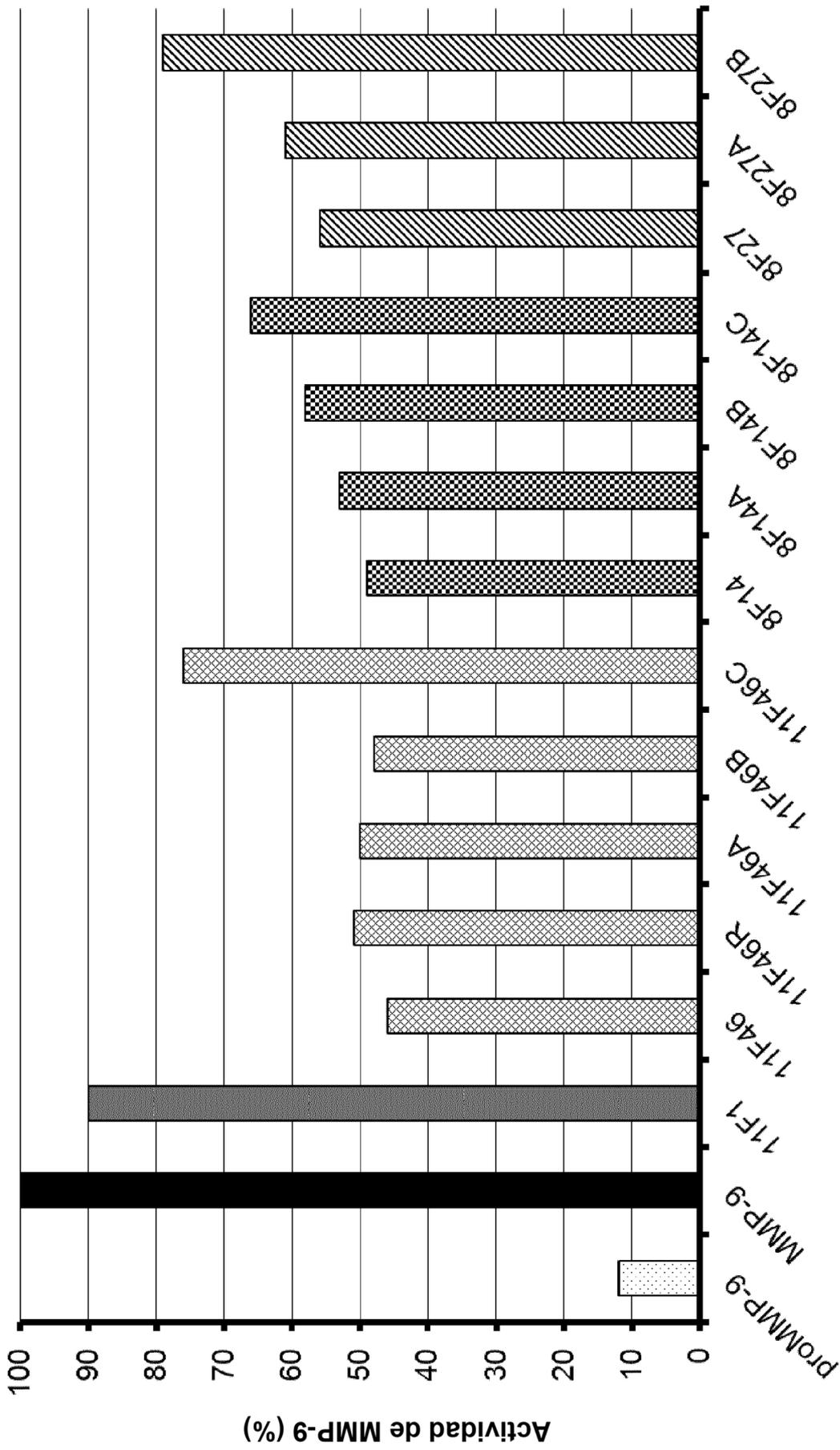


Figura 4

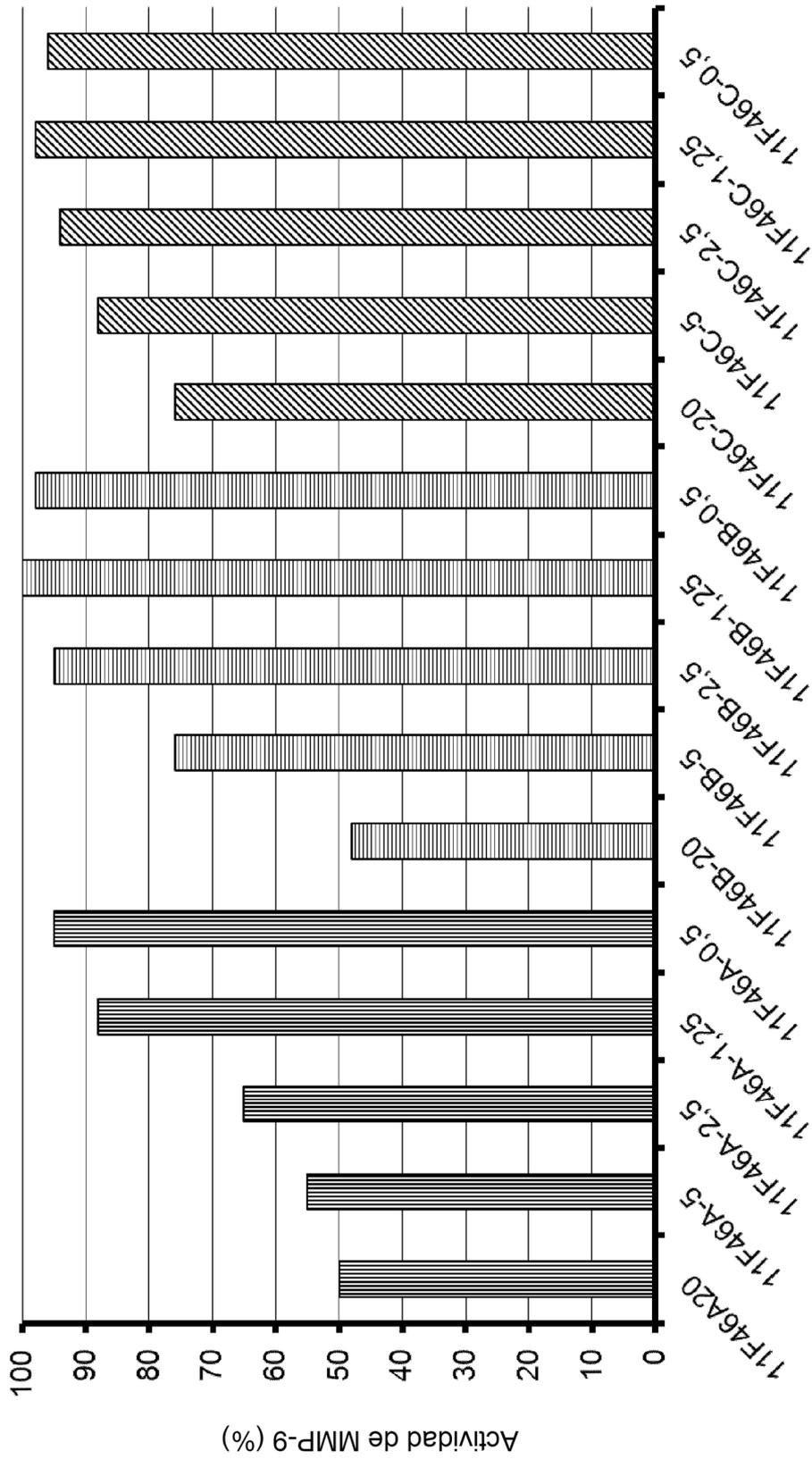


Figura 5

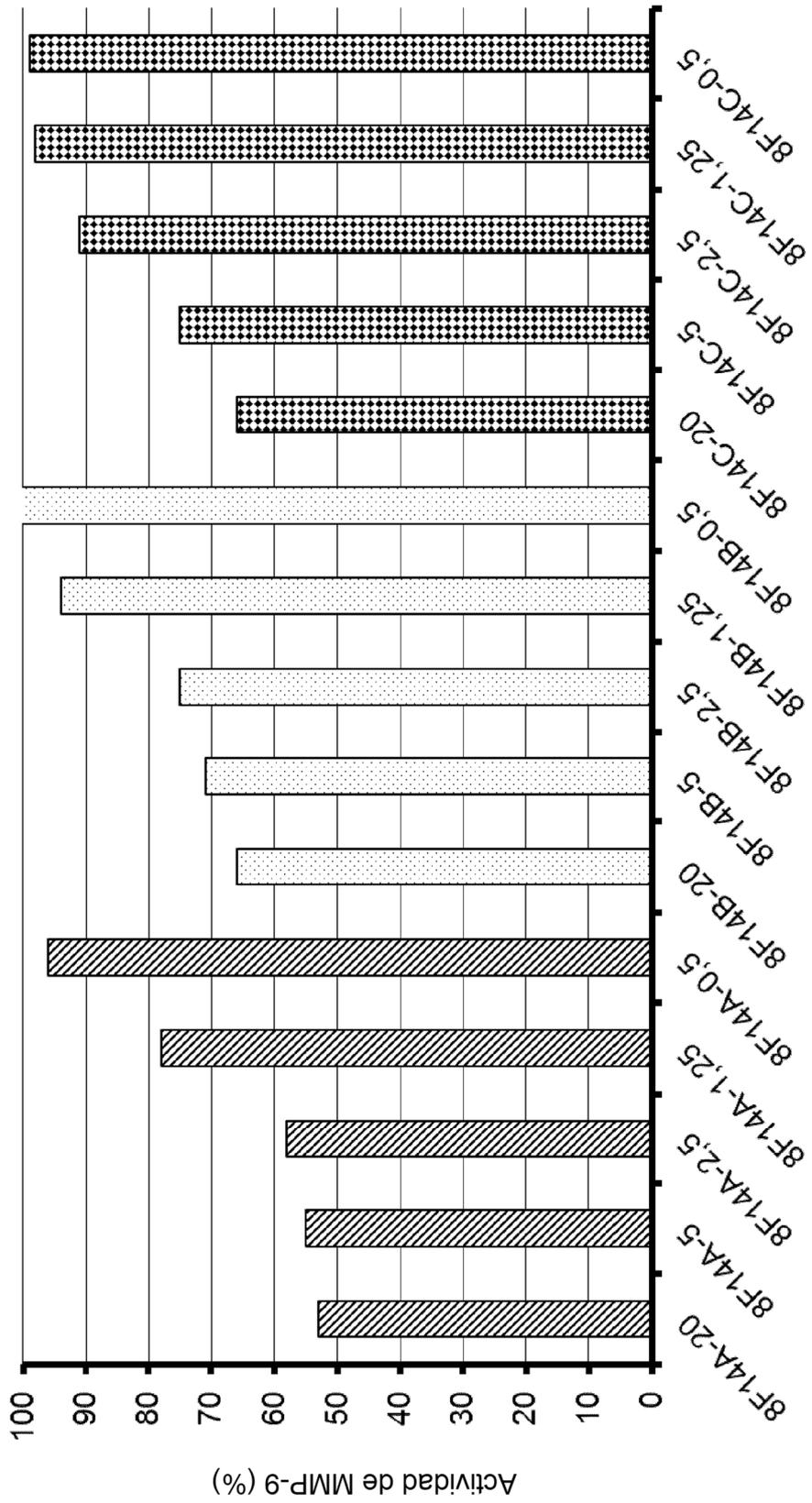


Figura 6