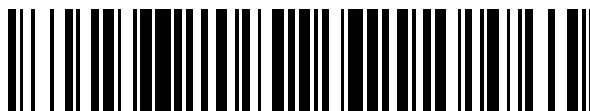


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 547 546**

51 Int. Cl.:

C07K 14/575 (2006.01)

C07K 14/33 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

C12N 9/64 (2006.01)

A61K 38/48 (2006.01)

A61K 47/48 (2006.01)

A61K 31/711 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.12.2005 E 10184150 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.06.2015 EP 2335718**

54 Título: **Conjugados de proteínas no citotóxicas**

30 Prioridad:

01.12.2004 GB 0426394

10.03.2005 GB 0504964

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

07.10.2015

73 Titular/es:

**THE SECRETARY OF STATE FOR HEALTH
(50.0%)**

Richmond House, 79 Whitehall

London SW1A 2NS, GB y

ALLERGAN, INC. (50.0%)

72 Inventor/es:

FOSTER, KEITH;

CHADDOCK, JOHN;

MARKS, PHILIP;

STANCOMBE, PATRICK;

AOKI, ROGER K.;

FRANCIS, JOSEPH y

STEWART, LANCE

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

ES 2 547 546 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

Conjugados de proteínas no citotóxicas

- 5 **[0001]** Esta invención se refiere a proteínas de fusión no citotóxicas, y a las aplicaciones terapéuticas de las mismas como moléculas analgésicas.
- 10 **[0002]** Por lo general, las toxinas se pueden dividir en dos grupos según el tipo de efecto que tienen sobre una célula diana. Con más detalle, el primer grupo de toxinas mata sus células dianas naturales, y por tanto se conocen como moléculas toxinas citotóxicas. Este grupo de toxinas se ejemplifica *inter alia* mediante toxinas vegetales como ricina, y abrina, y por toxinas bacterianas como la toxina de la difteria, y la exotoxina A de Pseudomonas. Las toxinas citotóxicas han atraído mucho interés para el diseño de "balas mágicas" (por ejemplo, inmunoconjugados, que comprenden un componente de toxina citotóxica y un anticuerpo que se une a un marcador específico de una célula diana) para el tratamiento de trastornos y dolencias celulares como el cáncer. Las toxinas citotóxicas matan típicamente sus células diana al inhibir los procesos celulares de la síntesis de proteínas.
- 15 **[0003]** El segundo grupo de toxinas, que se conocen como toxinas no citotóxicas no matan (como su nombre confirma) sus células dianas naturales. Las toxinas no citotóxicas han atraído mucho menos interés comercial que sus equivalentes citotóxicas, y ejercen su efecto sobre una célula diana por inhibición de procesos celulares distintos a la síntesis de proteínas. Las toxinas no citotóxicas se producen por diferentes plantas y por diferentes microorganismos, tales como Clostridium sp. y Neisseria sp.
- 20 **[0004]** Las neurotoxinas clostrídicas son proteínas que típicamente tienen un peso molecular de aproximadamente 150 kDa. Son producidas por diferentes especies de bacterias, especialmente del género Clostridium, de forma más importante *C. tetani* y varias cepas de *C. botulinum*, *C. butyricum* y *C. argentinense*. En la actualidad existen ocho clases diferentes de las neurotoxinas clostrídicas, concretamente: toxina tetánica, y toxina botulínica en sus serotipos A, B, C1, D, E, F y G, y todas comparten estructuras y modos de acción similares.
- 25 **[0005]** Las neurotoxinas clostrídicas representan un grupo principal de moléculas toxinas no citotóxicas, y se sintetizan por la bacteria hospedadora en forma de polipéptidos simples que se modifican post-traduccionalmente mediante un episodio de escisión proteolítica para formar dos cadenas polipeptídicas unidas entre sí por un puente disulfuro. Las dos cadenas se denominan la cadena pesada (cadena H), que tiene un peso molecular de aproximadamente 100 kDa, y la cadena ligera (cadena L), que tiene un peso molecular de aproximadamente 50 kDa.
- 30 **[0006]** Las cadenas L tienen una función proteasa (actividad endopeptidasa dependiente de cinc) y muestran una elevada especificidad de sustrato para las proteínas asociadas a vesículas y/o membrana plasmática implicadas en el proceso exocítico. Las cadenas L procedentes de diferentes especies o serotipos clostridiales pueden hidrolizar enlaces peptídicos diferentes pero específicos en tres proteínas sustrato, concretamente sinaptobrevina, syntaxina o SNAP-25. Estos sustratos son componentes importantes de la maquinaria neurosecretora.
- 35 **[0007]** Neisseria sp., principalmente de la especie *N. gonorrhoeae*, produce proteasas no citotóxicas funcionalmente similares. Un ejemplo de una proteasa de ese tipo es un proteasa IgA (consultar el documento WO99/58571).
- 40 **[0008]** Está bien documentado en la técnica que las moléculas toxinas se pueden redirigir a una célula que no sea la célula diana natural de la toxina. Cuando se redirigen, la toxina modificada es capaz de unirse a una célula diana deseada y, tras la translocación posterior en el citosol, es capaz de ejercer su efecto sobre las células diana. Dicho redireccionamiento se consigue al sustituir el Resto de Direccionamiento (TM) natural de la toxina por un TM diferente. A este respecto, el TM se selecciona de forma que se unirá a la célula diana deseada, y permitirá el paso posterior de la toxina modificada a un endosoma contenido en la célula diana. La toxina modificada comprende también un dominio de translocación que permite la entrada de la proteasa no citotóxica al citosol de la célula. El dominio de translocación puede ser el dominio de translocación natural de la toxina o puede ser un dominio de translocación diferente obtenido a partir de una proteína microbiana con actividad de translocación.
- 45 **[0009]** Por ejemplo, el documento WO94/21300 describe moléculas modificadas de neurotoxina clostrídica que son capaces de regular la densidad de Proteína Integral de Membrana (IMP) en la superficie celular de la célula diana. Las moléculas de neurotoxina modificadas son por tanto capaces de controlar la actividad celular (por ejemplo, la recaptación de glucosa) de la célula diana. Los documentos WO96/33273 y WO99/17806 describen moléculas modificadas de neurotoxina clostrídica que se dirigen a aferentes sensoriales periféricos. Las moléculas modificadas de neurotoxina son por tanto capaces de demostrar un efecto analgésico. El documento WO00/10598 describe la preparación de moléculas modificadas de neurotoxina clostrídica que se dirigen a células hipersecretoras de moco (o a las células neuronales que controlan dichas células hipersecretoras de moco), dichas neurotoxinas modificadas son capaces de inhibir la hipersecreción procedente de dichas células. El documento WO01/21213
- 50
- 55
- 60

describe moléculas modificadas de neurotoxina clostrídica que se dirigen a una amplia gama de tipos diferentes de células diana no neuronales. Las moléculas modificadas son por tanto capaces de evitar la secreción desde las células diana. Otras publicaciones en el campo técnico de las moléculas de toxina redirigida incluyen los documentos: WO00/62814; WO00/04926; US5.773.586; WO93/15766; WO00/61192; y WO99/58571.

[0010] La sustitución de TM anteriormente mencionada puede llevarse a cabo mediante técnicas convencionales de conjugación química, que son bien conocidas del experto en la técnica. A este respecto, se hace referencia a Hermanson, G.T. (1996), *Bioconjugate techniques*, Academic Press, y a Wong, S.S. (1991), *Chemistry of protein conjugation and cross-linking*, CRC Press.

[0011] Sin embargo, la conjugación química a menudo es imprecisa. Por ejemplo, tras la conjugación, un TM puede quedar unido a lo que resta de conjugado en más de un sitio de unión.

[0012] La conjugación química también es difícil de controlar. Por ejemplo, un TM puede quedar unido a lo que resta de la toxina modificada en un sitio de unión del componente de proteasa y/o en el componente de translocación. Esto es un problema cuando se desea solo la unión a uno de dichos componentes (preferiblemente en un único sitio) para conseguir eficiencia terapéutica.

[0013] De este modo, la conjugación química da como resultado una población mixta de moléculas de toxina modificada. lo que es indeseable.

[0014] Como alternativa a la conjugación química, la sustitución de TM se puede llevar a cabo por preparación de una proteína de fusión de un único polipéptido (consultar el documento WO98/07864). Esta técnica se basa en el mecanismo bacteriano *in vivo* por el cual se prepara la neurotoxina clostrídica natural (es decir, la holotoxina) y el resultado es una proteína de fusión que tiene la siguiente disposición estructural:

NH₂ – [componente de proteasa] - [componente de translocación] - [TM] – COOH

[0015] Según el documento WO98/07864, el TM se coloca hacia el extremo C de la proteína de fusión. La proteína de fusión se activa a continuación por tratamiento con una proteasa, se escinde en un sitio entre el componente de proteasa y el componente de translocación. De este modo se produce una proteína bicatenaria, que comprende el componente de proteasa como una cadena de polipéptido simple unido covalentemente (mediante un puente disulfuro) a otra cadena de polipéptido simple que contiene el componente de translocación y el TM. Aunque la metodología del documento WO98/07864 sigue (en términos de disposición estructural de la proteína de fusión) el sistema de expresión natural de la holotoxina clostrídica, los presentes inventores han encontrado que este sistema puede dar como resultado la producción de algunas proteínas de fusión que tienen una capacidad de unión sustancialmente reducida por la célula diana pretendida.

[0016] Por tanto, existe la necesidad de un sistema alternativo o mejorado para construir una proteína de fusión no citotóxica.

[0017] La presente invención resuelve uno o más de los problemas anteriormente mencionados al proporcionar una proteína de fusión de polipéptido monocatenario según se define en las reivindicaciones que se acompañan en la presente memoria.

[0018] El documento US5989545 describe derivados de la toxina clostrídica capaces de modificar las funciones aferentes sensoriales periféricas.

[0019] Los documentos WO 2004/024909 y WO 98/07864 describen fragmentos de toxina recombinantes.

[0020] El documento EP1422240 describe análogos peptídicos de nociceptina.

[0021] El documento WO 2005/023309 describe conjugados de toxinas redirigidos y los usos médicos de los mismos

[0022] El sistema del documento WO98107864 funciona bien para la preparación de conjugados que tienen un TM que requiere un dominio C terminal para interacción con un sitio de unión en una célula diana. A este respecto, el documento WO98/07864 proporciona proteínas de fusión que tienen un dominio C terminal que está "libre" para interactuar con un sitio de unión en una célula diana. Los presentes inventores han encontrado que esta disposición estructural no es adecuada para todos los TM. Una de estas categorías de TM es un grupo de TM que se unen a aferentes sensoriales nociceptores. Con más detalle, los presentes inventores han encontrado que el sistema de proteína de fusión del documento WO 98/07864 no es óptimo para los TM que requieren un dominio N terminal para interactuar con un sitio de unión de un aferente sensorial nociceptor. Este problema es particularmente importante con TM que requieren un resto aminoácido N-terminal específico o una secuencia específica de restos de aminoácido incluyendo el resto aminoácido N-terminal para interactuar con un sitio de unión de un aferente sensorial

nociceptor.

[0023] A diferencia del documento WO98/07864, la presente invención proporciona un sistema para preparar conjugados no citotóxicos, en el que el componente TM del conjugado incluye el dominio de unión relevante en un intradominio o en una secuencia de aminoácidos localizada hacia la parte central (es decir: de la secuencia de péptido lineal) del TM, o localizado preferiblemente hacia el extremo N del TM, o más preferiblemente en o cerca del extremo N. El dominio N-terminal es capaz de unirse a un sitio de unión de un aferente sensorial nociceptor, y el TM preferiblemente necesita que una secuencia de resto(s) de aminoácidos específica y definida esté libre en su extremo N.

[0024] El componente de proteasa no citotóxica de la presente invención es una proteasa no citotóxica, o un fragmento de la misma, dicha proteasa o fragmento de proteasa es capaz de escindir enlaces peptídicos diferentes pero específicos en tres proteínas sustrato, concretamente sinaptobrevina, syntaxina o SNAP-25, del aparato de fusión exocítico de un aferente sensorial nociceptor. Estos sustratos son componentes importantes de la maquinaria neurosecretora. El componente de proteasa no citotóxica de la presente invención es preferiblemente una proteasa IgA neisserial o fragmento de la misma o una cadena L de neurotoxina clostrídica o fragmento de la misma. Un componente de proteasa no citotóxica particularmente preferido es una cadena L de neurotoxina botulínica (BoNT) o un fragmento de la misma.

[0025] El componente de translocación de la presente invención permite la translocación de la proteasa no citotóxica (o fragmento de la misma) al interior de la célula diana de manera que la expresión funcional de la actividad proteasa se produzca en el citosol de la célula diana. El componente de translocación es preferiblemente capaz de formar poros permeables a iones en las membranas lipídicas en condiciones de pH bajo. Se ha descubierto preferiblemente el uso de únicamente aquellas porciones de la molécula de proteína capaces de formar poros dentro de la membrana endosómica. El componente de translocación se puede obtener de una fuente de proteína microbiana, en particular de una fuente de proteína bacteriana o vírica. De este modo, en una realización, el componente de translocación es un dominio de translocación de una enzima, tal como una proteína bacteriana o vírica. El componente de translocación de la presente invención es preferiblemente una cadena H de neurotoxina clostrídica o un fragmento de la misma. Lo más preferiblemente, se trata del dominio H_N (o de un componente funcional del mismo), en el que H_N significa una porción o fragmento de la cadena H de una neurotoxina clostrídica aproximadamente equivalente a la mitad aminoterminal de la cadena H, o el dominio correspondiente a dicho fragmento de la cadena H intacta.

[0026] El componente TM de la presente invención es responsable de unir el conjugado de la presente invención a un sitio de unión en una célula diana. De esta forma, el componente TM es meramente un ligando a través del cual un conjugado de la presente invención se une a una célula diana seleccionada.

[0027] En el contexto de la presente invención, la célula diana es un aferente sensorial nociceptor, preferiblemente un aferente nociceptor primario (por ejemplo, una fibra A como una fibra A δ o una fibra C). De esta forma, los conjugados de la presente invención son capaces de inhibir la liberación de neurotransmisores o neuromoduladores [por ejemplo, glutamato, sustancia P, péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP), y/o el neuropéptido Y] desde poblaciones discretas de neuronas aferentes sensoriales nociceptoras. Durante el uso, los conjugados reducen o evitan la transmisión de señales sensoriales aferentes (por ejemplo, neurotransmisores o neuromoduladores) desde las fibras periféricas a centrales del dolor, y de este modo tienen aplicación como moléculas terapéuticas para el tratamiento del dolor, en particular del dolor crónico.

[0028] De forma rutinaria se confirma que TM se une al aferente sensorial nociceptor. Por ejemplo, puede utilizarse un simple experimento de desplazamiento radioactivo en el que tejidos o células representativos del aferente sensorial nociceptor (por ejemplo, DRG) se exponen a un ligando marcado (por ejemplo tritiado) en presencia de un exceso de ligando no marcado. En un experimento de ese tipo, se pueden evaluar las proporciones relativas de unión específica y no específica, confirmando de este modo que el ligando se une a la célula diana aferente sensorial nociceptora. Opcionalmente, el ensayo puede incluir uno o más antagonistas de unión, y el ensayo puede incluir adicionalmente la observación de la pérdida de unión del ligando. Ejemplos de este tipo de experimento se pueden encontrar en Hulme, E.C. (1990), Receptor-binding studies, a brief outline, pp. 303-311, En Receptor biochemistry, A Practical Approach, Ed. E.C. Hulme, Oxford University Press.

[0029] Las proteínas de fusión de la presente invención demuestran en general una afinidad de enlace reducida (en la región de aproximadamente 100 veces) de las células diana aferentes sensoriales nociceptoras cuando se compara con el TM 'libre' correspondiente. Sin embargo, a pesar de esta observación, las proteínas de fusión de la presente invención demuestran sorprendentemente una buena eficacia. Esto se puede atribuir a dos características principales. En primer lugar, el componente de proteasa no citotóxica es catalítico —es decir, el efecto terapéutico de unas pocas de estas moléculas se amplifica rápidamente. En segundo lugar, los receptores presentes en el aferente sensorial nociceptor solo necesitan actuar como puerta de enlace para la entrada del compuesto terapéutico, y no necesitan estimularse necesariamente hasta el nivel requerido para conseguir una respuesta

farmacológica ligando-receptor. Según esto, las proteínas de fusión de la presente invención se pueden administrar a una dosis que es muy inferior a la que se usaría con otros tipos de moléculas analgésicas tales como AINE, morfina, y gabapentina. Estas últimas moléculas se administran típicamente en cantidades de muchos microgramos hasta el miligramo (incluso hasta cientos de miligramos), mientras que las proteínas de fusión de la presente invención se pueden administrar a dosis mucho más bajas, típicamente al menos 10 veces inferiores, y más típicamente 100 veces inferiores.

[0030] El TM comprende preferiblemente un máximo de 50 restos de aminoácidos, más preferiblemente un máximo de 40 restos de aminoácidos, de manera particularmente preferible un máximo de 30 restos de aminoácidos, y lo más preferiblemente un máximo de 20 restos de aminoácidos.

[0031] Los opioides representan un grupo preferido de los TM de la presente invención. Dentro de esta familia de péptidos se incluyen encefalinas (met y leu), endomorfina 1 y 2, β -endorfina y dinomorfina. Los péptidos opioides se utilizan frecuentemente en clínica para modificar la actividad de los nociceptores y de otras células implicadas en la respuesta al dolor. Como se ejemplifica en la escala analgésica de tres etapas de la Organización Mundial de la Salud, los opioides tienen puntos de entrada en el tratamiento del dolor crónico tanto producido como no producido por cáncer, subrayando su importancia en el tratamiento del dolor. La referencia a los opioides abarca fragmentos, variantes y derivados de los mismos, que retienen la capacidad de unirse a los aferentes sensoriales nociceptores.

[0032] El TM de la invención puede ser también una molécula que actúa como un "agonista" en uno o más de los receptores presentes en un aferente sensorial nociceptor, más particularmente en un aferente nociceptor primario. Convencionalmente, se considera agonista cualquier molécula que puede aumentar o disminuir las actividades en una célula, concretamente cualquier molécula que simplemente produzca una alteración de la actividad celular. Por ejemplo, el significado convencional de un agonista incluiría una sustancia química capaz de combinarse con un receptor de una célula e iniciar una reacción o una actividad, o un fármaco que induce una respuesta activa por activación de los receptores, en donde la respuesta es un aumento o disminución de la actividad celular.

[0033] Sin embargo, para el objetivo de esta invención, un agonista se define más específicamente como una molécula que es capaz de estimular el proceso de fusión exocítica en una célula diana, dicho proceso es susceptible de inhibición mediante una proteasa (o fragmento de la misma) capaz de escindir una proteína del aparato de fusión exocítica en dicha célula diana.

[0034] Según esto, la definición particular de agonista de la presente invención excluiría muchas moléculas que convencionalmente se consideran como agonistas. Por ejemplo, el factor de crecimiento nervioso (FCN) es un agonista con respecto a su capacidad para promover la diferenciación neuronal por unión a un receptor TrkA. Sin embargo, el FCN no es un agonista cuando se evalúa según los criterios anteriores porque no es un inductor principal de la fusión exocítica. Adicionalmente, el proceso mediante el que el FCN estimula (es decir, la diferenciación celular) no es susceptible de inhibición mediante la actividad proteasa de una molécula de toxina no citotóxica.

[0035] Las propiedades agonistas de un TM que se une a un receptor de un aferente nociceptor se pueden confirmar usando los procedimientos descritos en el Ejemplo 10.

[0036] En una realización preferida de la invención, la diana del TM es el receptor ORL₁. Este receptor es un miembro de la clase de receptores acoplados a la proteína G, y tiene siete estructuras de dominios transmembrana. Las propiedades del receptor ORL₁ se han descrito en detalle en Mogil y Pasternak (2001), *Pharmacological Reviews*, Vol. 53, Nº 3, páginas 381-415.

[0037] En una realización, el TM es una molécula que se une (preferiblemente que se une específicamente) al receptor ORL₁. Más preferiblemente, el TM es un "agonista" del receptor ORL₁. El término "agonista" en este contexto se define como anteriormente.

[0038] Las propiedades agonistas de un TM que se une a un receptor ORL₁ se pueden confirmar usando los procedimientos descritos en el Ejemplo 10. Estos procedimientos están basados en experimentos anteriores [consultar Inoue y col. 1998 [Proc. Natl. Acad. Sci., 95, 10949-10953]], que confirman que el agonista natural del receptor ORL₁, la nociceptina, origina la inducción de la liberación de sustancia P desde las neuronas aferentes primarias nociceptoras. Esto se respalda por el hecho que:

- las respuestas inducidas por la nociceptina quedan abolidas por los agonistas específicos del receptor NK1 (el receptor de la sustancia P); y
- el pretratamiento de las células con capsaicina (que agota la sustancia P procedente de neuronas primarias aferentes de pequeño tamaño) atenúa las respuestas inducidas por la nociceptina.

[0039] De forma similar, Inoue y col. confirman que una inyección intraplantar de la neurotoxina botulínica de tipo A elimina las respuestas inducidas por la nociceptina. Puesto que se sabe que BoNT inhibe la liberación de sustancia P desde las neuronas aferentes primarias Welch y col., 2000, *Toxicon*, 38, 245-258), esto confirma la relación entre nociceptina-ORL, la interacción y posterior liberación de la sustancia P.

5

[0040] De este modo, se puede considerar que un TM tiene actividad agonista del receptor ORL₁ si el TM origina una inducción de la liberación de sustancia P desde una neurona aferente sensorial nociceptora (ver el Ejemplo 10).

10 **[0041]** En una realización particularmente preferida de la invención, el TM es nociceptina –el ligando natural del ORL₁. La nociceptina se dirige al receptor ORL₁ con elevada afinidad. Entre los ejemplos de otros TM se incluyen:

Código	Secuencia	Ref.	SEQ ID NO:
Nociceptina 1-17	FGGFTGARKSARKLANQ	[1]	37,38
Nociceptina 1-11	FGGFTGARKSA	[1]	39,40
Nociceptina [Y10]1-11	FGGFTGARKYA	[1]	41,42
Nociceptina [Y11]1-11	FGGFTGARKSY	[1]	43,44
Nociceptina [Y14]1-17	FGGFTGARKSARKYANQ	[1]	45,46
Nociceptina 1-13	FGGFTGARKSARK	[2]	47,48
Nociceptina [R14K15] 1-17 (también conocida en esta memoria descriptiva como "variante de nociceptina")	FGGFTGARKSARKRKNQ	[3,4]	49,50
Péptido agonista	Péptidos agonistas procedentes de un enfoque de biblioteca combinatoria	[5]	-

[1] Mogil y Pasternak, 2001, *Pharmacol. Rev.*, 53, 381-415),
 [2] Maile y col., 2003, *Neurosci. Lett.*, 350, 190-192),
 [3] Rizzi y col., 2002, *J. Pharmacol. Exp. Therap.*, 300, 57-63
 [4] Okada y col., 2000, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 278, 493-498
 [5] Dooley y col., 1997, *J Pharmacol Exp Ther.* 283(2), 735-41

15 **[0042]** El TM "variante" anteriormente identificado demuestra una afinidad de enlace particularmente buena (en comparación con la nociceptina natural) para aferentes sensoriales nociceptores. Esto es sorprendente porque las modificaciones en los aminoácidos se producen en una posición lejana del extremo N del TM. Además, las modificaciones son prácticamente en el extremo C del TM, que a su vez se une a una secuencia de polipéptidos larga (es decir, el dominio de translocación). Hablando en general, una proteína de fusión que contiene un TM demostrará una reducción de aproximadamente 100 veces en su capacidad de enlace con respecto al TM solo. El TM "variante" anteriormente mencionado demuestra por sí mismo un aumento de 3 a 10 veces en la capacidad de enlace para un aferente sensorial nociceptor (por ejemplo, vía el receptor ORL₁) respecto de la nociceptina natural. De esta forma, podría esperarse que una proteína de fusión que contienen un TM "variante" muestre una reducción de aproximadamente 10 veces en la capacidad de enlace para un aferente sensorial nociceptor (por ejemplo, vía el receptor ORL₁) respecto de la nociceptina natural. Sin embargo, los presentes inventores han demostrado que dichas proteínas de fusión que contienen un TM "variante" muestran una capacidad de enlace que (de lo más sorprendente) imita estrechamente el de la nociceptina 'libre' – consultar la Figura 14.

20 **[0043]** En el contexto de la presente invención, el término opioide o agonista del receptor ORL₁ (tal como nociceptina, o uno cualquiera de los péptidos relacionados en la tabla anterior) abarca moléculas que tienen al menos un 70%, preferiblemente al menos un 80%, más preferiblemente al menos un 90%, y lo más preferiblemente al menos un 95% de homología con dicho opioide o antagonista. Los homólogos agonistas retienen las propiedades agonistas de la nociceptina en el receptor ORL₁, que se pueden probar utilizando los procedimientos proporcionados en el Ejemplo 10. De forma similar, un homólogo opioide retiene sustancialmente la función de unión del opioide con el que muestra elevada homología.

30 **[0044]** La invención también abarca fragmentos, variantes, y derivados de uno cualquiera de los TM descritos anteriormente. Estos fragmentos, variantes, y derivados retienen sustancialmente las propiedades adscritas a dichos

35

TM.

5 **[0045]** Además de las clases de TM opioides y no opioides anteriormente mencionados, otros polipéptidos diferentes son adecuados para dirigir los conjugados de la presente invención a los aferentes sensoriales nociceptores (por ejemplo a los nociceptores). A este respecto, se hace referencia particular a la galanina y los derivados de galanina. Los receptores de la galanina se encuentran pre y postsinápticamente en los DRG (Liu y Hokfelt, (2002), Trends Pharm. Sci., 23(10), 468-74), y tienen una expresión potenciada durante los estados de dolor neuropático. Los receptores activados mediante proteinasa (PAR) son también un grupo preferido de los TM de la presente invención, particularmente con PAR-2. Se sabe que los agonistas de PAR-2 inducen/estimulan la inflamación aguda, en parte mediante un mecanismo neurogénico. PAR2 se expresa por las neuronas aferentes de la médula espinal, y los agonistas de PAR2 estimulan la liberación de sustancia P (SP) y del péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) en tejidos periféricos.

10 **[0046]** Un conjunto particularmente preferido de TM de la presente invención incluye:

Ligando	Referencia
Nociceptina	Guerrini, y col., (1997) J. Med. Chem., 40, pp. 1789-1793
β-endorfina	Blanc, y col., (1983) J. Biol. Chem., 258(13), pp. 8277-8284
Endomorfina-1; Endomorfina-2	Zadina, y col., (1997). Nature, 386, pp. 499-502
Dinorfina	Fields y Basbaum (2002) Capítulo 11, en The Textbook of Pain, Wall y Melzack eds.
Met-enkefalina	Fields y Basbaum (2002) Capítulo 11, en The Textbook of Pain, Wall y Melzack eds.
Leu-enkefalina	Fields y Basbaum (2002) Capítulo 11, en The Textbook of Pain, Wall y Melzack eds.
Galanina	Xu y col. , (2000) Neuropeptides, 34 (3&4), 137-147
Péptido PAR-2	Vergnolle y col., (2001) Nat. Med., 7(7), 821-826

15 **[0047]** El sitio de escisión por la proteasa de la presente invención permite la escisión (preferiblemente la escisión controlada) de la proteína de fusión en una posición entre el componente de proteasa no citotóxica y el componente TM. Es esta reacción de escisión la que convierte la proteína de fusión de un polipéptido monocatenario en un péptido bicatenario unido por un puente disulfuro.

20 **[0048]** Según una realización preferida de la presente invención, el TM se une mediante un dominio o secuencia de aminoácidos que se localiza lejos del extremo C del TM. Por ejemplo, el dominio de unión relevante puede incluir un intradominio o una secuencia de aminoácidos ubicados hacia la parte central (es decir, de la secuencia de péptido lineal) del TM. Preferiblemente, el dominio de unión relevante se localiza hacia el extremo N del TM, más preferiblemente en o cerca del extremo N.

25 **[0049]** En una realización, la fusión de polipéptido monocatenario puede incluir más de un sitio de escisión proteolítico. Sin embargo, cuando existen dos o más de estos sitios, son diferentes, evitando sustancialmente de esta forma la aparición de varios procesos de escisión en presencia de una única proteasa. En otra realización, se prefiere que la fusión de un polipéptido monocatenario tenga un único sitio de escisión por proteasa.

30 **[0050]** La(s) secuencia(s) de escisión de la proteasa pueden introducirse (y/o eliminarse cualquier secuencia

de escisión inherente) en el ADN por medios convencionales, tales como mutagénesis sitiodirigida. El cribado para confirmar la presencia de secuencias de escisión se puede llevar a cabo manualmente o con la ayuda de un programa informático (por ejemplo, el programa MapDraw de DNASTAR, Inc.).

[0051] Aunque se puede utilizar cualquier sitio de escisión por la proteasa, se prefieren los siguientes:

5	Enteroquinasas	(DDDDK↓)
	Factor Xa	(IEGR↓/IDGR↓)
	TEV (Virus del grabado del tabaco)	(ENLYFQ↓G)
	Trombina	(LVPR↓GS)
10	PreScission	(LEVLQ↓GP).

[0052] También la inteína se incluye en la acepción de sitio de escisión por la proteasa, que es una secuencia de autoescisión. La reacción de autoescisión se puede controlar, por ejemplo por variación en la concentración del agente reductor presente.

[0053] Durante el uso, el sitio de escisión por la proteasa se escinde en la región del extremo N (preferiblemente en el extremo N) del TM que queda expuesto. El polipéptido resultante tiene un TM con un dominio de extremo N o un intradominio que está sustancialmente libre para el resto del conjugado. Esta disposición asegura que el componente de extremo N (o intradominio) del TM puede interactuar directamente con un sitio de unión en una célula diana.

[0054] El TM y el sitio de escisión por la proteasa están separados entre sí en la proteína de fusión por como máximo 10 restos de aminoácidos, más preferiblemente por como máximo 5 restos de aminoácidos. De esta forma, después de la escisión del sitio de escisión por la proteasa, se proporciona un conjugado con una TM que tiene un dominio de extremo N que está sustancialmente libre para el resto del conjugado. Esta disposición asegura que el componente de extremo N del resto de reconocimiento puede interactuar directamente con un sitio de unión en una célula diana.

[0055] Una ventaja asociada con la etapa de activación anteriormente mencionada es que el TM solo se vuelve susceptible a la degradación del extremo N una vez que se ha producido una escisión proteolítica de la proteína de fusión. Adicionalmente, la selección de un sitio de escisión por la proteasa específico permite la activación selectiva de la fusión del polipéptido en una conformación bicatenaria.

[0056] La construcción del polipéptido de fusión monocatenario de la presente invención coloca el sitio de escisión por la proteasa entre el TM y el componente de proteasa no citotóxica.

[0057] Es preferente que, en la fusión monocatenaria, el TM se ubique entre el sitio de escisión por la proteasa y el componente de translocación. Esto asegura que el TM está unido al dominio de translocación (es decir, tal como sucede con la holotoxina clostrídica natural), mientras que en el caso de la presente invención el orden de los dos componentes está invertido en referencia a la holotoxina natural. Una ventaja adicional de esta disposición es que el TM se ubica en una región bucle expuesta de la proteína de fusión, lo que tiene efectos estructurales mínimos sobre la conformación de la proteína de fusión. A este respecto, dicho bucle se denomina de diferentes maneras, como el enlazante, el bucle de activación, el enlazante intradominio, o simplemente el bucle de superficie expuesta (Schiavo y col., 2000, Phys. Rev., 80, 717-766; Turton y col., 2002, Trends Biochem. Sci., 27, 552-558).

[0058] En una realización, en el péptido monocatenario, el componente de proteasa no citotóxica y el componente de translocación están unidos entre sí mediante un puente disulfuro. De esta forma, después de la escisión del sitio de escisión por la proteasa, el polipéptido asume una conformación bicatenaria, en la que los componentes de proteasa y de translocación permanecen unidos entre sí mediante el puente disulfuro. Para este fin, es preferente que la proteasa y los componentes de translocación estén separados entre sí en la proteína de fusión monocatenaria por un máximo de 100 restos de aminoácido, más preferiblemente un máximo de 80 restos de aminoácidos, de manera particularmente preferible un máximo de 60 restos de aminoácidos, y lo más preferible por un máximo de 50 restos de aminoácidos,

[0059] En una realización, el componente de proteasa no citotóxica forma un puente disulfuro con el componente de translocación de la proteína de fusión. Por ejemplo, el resto de aminoácido del componente de proteasa que forma el puente disulfuro se ubica entre los últimos 20, preferiblemente entre los últimos 10 restos de aminoácido del extremo C del componente de proteasa. De forma similar, el resto de aminoácido contenido en el componente de translocación que forma la segunda parte del puente disulfuro puede ubicarse entre los primeros 20, preferiblemente entre los primeros 10 restos de aminoácido del extremo N del componente de translocación.

[0060] Alternativamente, en el péptido monocatenario, el componente de proteasa no citotóxica y el TM pueden estar unidos entre sí mediante un puente disulfuro. A este respecto, el resto de aminoácido del TM que forma el puente disulfuro se localiza preferiblemente lejos del extremo N del TM, más preferiblemente hacia el extremo C del TM.

[0061] En una realización, el componente de proteasa no citotóxica forma un puente disulfuro con el componente de la proteína de fusión. A este respecto, el resto de aminoácido del componente de proteasa que forma el puente disulfuro se ubica preferiblemente entre los últimos 20, más preferiblemente entre los últimos 10 restos de aminoácido del extremo C del componente de proteasa. De forma similar, el resto de aminoácido contenido en el componente TM que forma la segunda parte del puente disulfuro se ubica preferiblemente entre los primeros 20, más preferiblemente entre los últimos 10 restos de aminoácido del extremo C del componente de TM.

[0062] Las disposiciones anteriores del enlace disulfuro tienen la ventaja de que los componentes proteasa y de translocación están dispuestos de manera similar a la de la neurotoxina clostrídica natural. Por comparación, en referencia a la secuencia de aminoácidos primaria de la neurotoxina clostrídica natural, los respectivos restos de aminoácido cisteína están separados por entre 8 y 27 restos de aminoácidos – tomado de Popoff, MR y Marvaud, J-C, 1999, Structural & genomic features of clostridial neurotoxins, Capítulo 9, en The Comprehensive Sourcebook of Bacterial Protein Toxins. Ed. Alouf & Freer:

Serotipo ¹	Secuencia	Longitud natural entre C-C
BoNT/A1	CVRGIITSKTKS----LDKGYNKALNDLC	23
BoNT/A2	CVRGIIPFKTKS----LDEGYNKALNDLC	23
BoNT/B	CKSVKAPG-----IC	8
BoNT/C	CHKAIIDGRS-----LYNKTLDC	15
BoNT/D	CLRLTK-----NSRDDSTC	12
BoNT/E	CKN-IVSVK-----GIRK---SIC	13
BoNT/F	CKS-VIPRK-----GTKAPP-RLC	15
BoNT/G	CKPVMYKNT-----GKSE----QC	13
TeNT	CKKIIPPTNIRENLYNRTASLTDLGGELC	27
¹ Información procedente solo de cepas proteolíticas		

[0063] La proteína de fusión puede comprender una o más etiquetas de purificación, que están ubicadas en el extremo N respecto al componente de proteasa y/o en el extremo C respecto al componente de translocación.

[0064] Aunque se puede utilizar cualquier etiqueta de purificación, se prefieren los siguientes:
 His-tag (por ejemplo 6 x histidina), preferiblemente como etiqueta del extremo C y/o del extremo N
 MBP-tag (proteína de unión a maltosa), preferiblemente como etiqueta del extremo N
 GST-tag (glutación-S-transferasa), preferiblemente como etiqueta del extremo N
 His-MBP-tag, preferiblemente como etiqueta del extremo N
 GST-MBP-tag, preferiblemente como etiqueta del extremo N
 Tioredoxina-tag, preferiblemente como etiqueta del extremo N
 CBD-tag (dominio de unión a quitina), preferiblemente como etiqueta del extremo N.

[0065] Según otra realización adicional de la presente invención, se pueden incluir uno o más péptidos separadores en la proteína de fusión. Por ejemplo, se puede incluir un péptido separador entre una etiqueta de purificación y el resto de la molécula de proteína de fusión (por ejemplo entre una etiqueta de purificación del extremo N y un componente de proteasa de la presente invención; y/o entre una etiqueta de purificación del extremo C y un componente de translocación de la presente invención). También se puede emplear un péptido separador entre los componentes de TM y de translocación de la presente invención.

[0066] Se pueden utilizar moléculas separadoras variadas en cualquiera de las proteínas de fusión de la presente invención. Los ejemplos de dichas moléculas separadoras incluyen los ilustrados en las Figuras 28 y 29. Mención particular se realiza en el presente documento a GS15, GS20, GS25, y Hx27 – consultar las Figuras 28 y 29.

[0067] Los presentes inventores han descubierto inesperadamente que las proteínas de fusión (por ejemplo, CPNv/A) de la presente invención pueden demostrar una actividad de enlace mejorada por los aferentes sensoriales nociceptores cuando el tamaño del separador se selecciona de forma que (en uso) el extremo C del TM y el extremo N del componente de translocación estén separados entre sí por 40-105 angstroms, preferiblemente por 50-100 angstroms, y más preferiblemente por 50-90 angstroms. En otra realización, los separadores preferidos tienen una

secuencia de aminoácidos de 11-29 restos de aminoácido, preferiblemente 15-27 restos de aminoácido, y más preferiblemente 20-27 restos de aminoácido. Los separadores adecuados pueden identificarse y obtenerse de forma rutinaria según Crasto, C.J. y Feng, J.A. (2000) Mayo, 13(5), pp. 309-312 – consultar también <http://www.fccc.edu/research/labs/feng/limker.html>.

[0068] Según un segundo aspecto de la presente invención, se proporciona una secuencia de ADN que codifica el polipéptido monocatenario anteriormente mencionado. En un aspecto preferido de la presente invención, la secuencia de ADN se prepara como parte de un vector de ADN, en el que el vector comprende un promotor y un terminador.

[0069] En una realización preferida, el vector tiene un promotor seleccionado de:

Promotor	Agente de inducción	Condición de inducción habitual
----------	---------------------	---------------------------------

Tac (híbrido)	IPTG	0,2 mM (0,05-2,0 mM)
---------------	------	----------------------

AraBAD	L-arabinosa	0,2% (0,002-0,4%)
--------	-------------	-------------------

operador T7- <i>lac</i>	IPTG	0,2 mM (0,05-2,0 mM)
-------------------------	------	----------------------

[0070] La construcción de ADN de la presente invención se diseña preferiblemente *in silico*, y a continuación se sintetiza mediante técnicas convencionales de síntesis de ADN.

[0071] La información de la secuencia de ADN anteriormente mencionada está modificada opcionalmente mediante desvío de codón según el sistema de expresión de la célula hospedadora definitiva (por ejemplo *E. coli*) que se va a utilizar.

[0072] El armazón de ADN se criba preferiblemente para buscar cualquier secuencia de ácido nucleico inherente, que cuando se transcribe y traduce produce una secuencia de aminoácidos correspondiente al sitio de escisión por la proteasa codificado por la segunda secuencia codificante de péptido. Este cribado se puede llevar a cabo manualmente o con la ayuda de un programa informático (por ejemplo, el programa MapDraw de DNASTAR, Inc.).

[0073] Según otra realización adicional de la presente invención, se proporciona un procedimiento para preparar un agente no citotóxico, que comprende:

- poner en contacto una proteína del polipéptido de fusión monocatenario de la presente invención con una proteasa capaz de escindir el sitio de escisión por la proteasa;
- escindir el sitio de escisión por la proteasa, y formar de esta manera una proteína de fusión bicatenaria.

[0074] Este aspecto proporciona un polipéptido bicatenario, que en general imita la estructura de la holotoxina clostrídica. Con más detalle, el polipéptido bicatenario resultante tiene típicamente una estructura en la que:

- la primera cadena comprende la proteasa no citotóxica, o un fragmento de la misma, dicha proteasa o fragmento de proteasa es capaz de escindir una proteína del aparato de fusión exocítica de un aferente sensorial nociceptor;
 - la segunda cadena comprende el TM y el dominio de translocación que es capaz de translocar la proteasa o fragmento de la proteasa del interior de un endosoma, a través de la membrana endosómica y al citosol del aferente sensorial nociceptor; y
- las cadenas primera y segunda están unidas entre sí mediante disulfuro.

[0075] Según otro aspecto adicional de la presente invención, se proporciona el uso de un polipéptido monocatenario o bicatenario de la invención, para la fabricación de un medicamento para tratar, evitar o mejorar el dolor.

[0076] La presente invención resuelve una amplia gama de dolencias dolorosas, en particular dolencias con dolor crónico, en particular el dolor crónico. Las dolencias preferidas incluyen dolor canceroso y no canceroso, dolor inflamatorio y dolor neuropático. Las fusiones opioides de la presente solicitud resultan particularmente adecuadas para resolver el dolor inflamatorio, aunque pueden resultar menos adecuadas para resolver el dolor neuropático. Las fusiones de galanina son más adecuadas para resolver el dolor neuropático.

[0077] Durante el uso, los polipéptidos de la presente invención se emplean típicamente en forma de una composición farmacéutica en asociación a un vehículo, diluyente y/o portador farmacéuticos, aunque la forma exacta

de la composición puede ajustarse al modo de administración. La administración se realiza preferiblemente a un mamífero, más preferiblemente a un ser humano.

5 **[0078]** Los polipéptidos pueden por ejemplo, emplearse en forma de una disolución estéril para administración intraarticular o administración intracraneal. Se prefiere la inyección en la espina dorsal (por ejemplo, epidural o intratecal).

10 **[0079]** Los intervalos de dosificación para la administración de los polipéptidos de la presente invención son los que producen el efecto terapéutico deseado. Se apreciará que los intervalos de dosificación requeridos dependerán de la naturaleza precisa de los componentes, la ruta de administración, la naturaleza de la formulación, la edad del paciente, la naturaleza, extensión o gravedad de la dolencia del paciente, las contraindicaciones, si hay alguna, y el juicio clínico del médico a cargo del paciente.

15 **[0080]** Las dosificaciones diarias adecuadas están en el intervalo de 0,0001-1 mg/kg, preferiblemente 0,0001-0,5 mg/kg, más preferiblemente 0,002-0,5 mg/kg, y de manera particularmente preferible 0,004-0,5 mg/kg. La dosis unitaria puede variar de menos de 1 microgramo hasta 30 mg, pero típicamente estará en la región de 0,01 a 1 mg por dosis, que se puede administrar diariamente o preferiblemente con menos frecuencia, tal como semanalmente o cada seis meses.

20 **[0081]** Una pauta terapéutica particularmente preferida se basa en 2,5 ng de la proteína de fusión (por ejemplo CPNv/A) como la dosis 1X. A este respecto, las dosis preferidas están en el intervalo 1X-100X (es decir, 2,5-250 ng). Este intervalo de dosificación es significativamente inferior (es decir, al menos 10 veces, típicamente 100 veces menos) de las que usarían con otros tipos de moléculas analgésicas tales como AINE, morfina, y gabapentina. Además, la diferencia anteriormente mencionada se amplía considerablemente cuando se realiza la comparación en base molar –esto es debido a que las proteínas de fusión de la presente invención tienen un Pm considerablemente mayor del de las moléculas terapéuticas convencionales ‘pequeñas’.

25 **[0082]** Sin embargo, se espera una amplia variación en la dosis requerida, dependiendo de la naturaleza precisa de los componentes, y de las distintas eficacias de las diferentes rutas de administración.

30 **[0083]** Las variaciones en los niveles de dosificación se pueden ajustar mediante las rutinas empíricas estandarizadas para la optimización, como es bien sabido en la técnica.

35 **[0084]** Las composiciones adecuadas para inyección pueden estar en la forma de disoluciones, suspensiones o emulsiones, o de polvo seco que se ha de disolver o suspender en un vehículo adecuado antes del uso.

40 **[0085]** Las formas de dosificación unitaria fluidas se preparan típicamente en un vehículo estéril exento de pirógenos. Los principios activos, dependiendo del vehículo y concentración usados, pueden tanto disolverse como suspenderse en el vehículo.

45 **[0086]** En la preparación de las disoluciones para administración, los polipéptidos se pueden disolver en un vehículo, volviéndose isotónica la disolución si es necesario por adición de cloruro de sodio y se esteriliza por filtración a través de un filtro estéril usando condiciones asépticas antes de rellenar y sellar los viales o botellas estériles adecuados. Alternativamente, si la estabilidad de la disolución es adecuada, la disolución en su envase sellado puede esterilizarse por autoclavado.

[0087] Ventajosamente, se pueden disolver en el vehículo aditivos como agentes tamponantes, solubilizantes, estabilizantes, conservantes o bactericidas, suspensores o emulsionantes.

50 **[0088]** El polvo seco que se ha de disolver o suspender en un vehículo adecuado antes del uso puede prepararse introduciendo la sustancia farmacológica y el resto de ingredientes previamente esterilizados en un envase esterilizado usando una técnica aséptica en un área estéril.

55 **[0089]** Alternativamente, los polipéptidos y el resto de ingredientes se pueden disolver en un vehículo acuoso, la solución se esteriliza por filtración y se distribuye en envases adecuados usando una técnica aséptica en un área estéril. A continuación, el producto se criodeseca y los envases se sellan asépticamente.

60 **[0090]** Las suspensiones parenterales, adecuadas para inyección intramuscular, subcutánea o intradérmica, se preparan sustancialmente de la misma forma, excepto en que los componentes estériles se suspenden en un vehículo estéril, en lugar de disolverse y la esterilización no puede llevarse a cabo por filtración. Los componentes pueden aislarse en un estado estéril o alternativamente se pueden esterilizar tras el aislamiento, por ejemplo, mediante irradiación gamma.

[0091] Ventajosamente, se incluye un agente de suspensión, por ejemplo, polivinilpirrolidona, en la

composición para facilitar la distribución de los componentes.

SECCIÓN DE DEFINICIONES

5 **[0092]** Resto de reconocimiento (TM) significa cualquier estructura química asociada con un agente que interactúe funcionalmente con un sitio de unión para producir una asociación física entre el agente y la superficie de una célula diana. En el contexto de la presente invención, la célula diana es un aferente sensorial nociceptor. El término TM abarca cualquier molécula (es decir, una molécula natural o una variante química/físicamente modificada de la misma) que es capaz de unirse a un sitio de unión en la célula diana, dicho sitio de unión es capaz de internalización (por ejemplo, formación de un endosoma) –también denominada como endocitosis mediada por el receptor. El TM puede tener una función de translocación de membrana endosómica, en cuyo caso no se necesita que los componentes TM y dominio de translocación estén presentes en un agente de la presente invención.

15 **[0093]** El TM de la presente invención se une (preferiblemente de manera específica) a un aferente sensorial nociceptor (por ejemplo, un aferente nociceptor primario). A este respecto, unión significa específicamente que el TM se une a un aferente sensorial nociceptor por ejemplo, un aferente nociceptor primario) con una afinidad mayor que la de unión a otras neuronas tales como aferentes no nociceptores, y/o a neuronas motoras (es decir la diana natural de la holotoxina neurotoxina clostrídica). El término “unión específica” puede significar también que un TM dado se une a un receptor dado, por ejemplo el receptor ORL₁, con una constante de afinidad (K_a) de 10⁶ M⁻¹ o mayor, preferiblemente 10⁷ M⁻¹ o mayor, más preferiblemente 10⁸ M⁻¹ o mayor, y lo más preferiblemente, 10⁹ M⁻¹ o mayor.

25 **[0094]** Para el objetivo de esta invención, un agonista se define como una molécula que es capaz de estimular el proceso de fusión exocítica en una célula diana, dicho proceso es susceptible de inhibición mediante una proteasa (o fragmento de la misma) capaz de escindir una proteína del aparato de fusión exocítica en dicha célula diana.

[0095] Según esto, la definición particular de agonista de la presente invención excluiría muchas moléculas que convencionalmente se consideran como agonistas.

30 **[0096]** Por ejemplo, el factor de crecimiento nervioso (FCN) es un agonista con respecto a su capacidad para promover la diferenciación neuronal por unión a un receptor TrkA. Sin embargo, el FCN no es un agonista cuando se evalúa según los criterios anteriores porque no es un inductor principal de la fusión exocítica. Adicionalmente, el proceso mediante el que el FCN estimula (es decir, la diferenciación celular) no es susceptible de inhibición mediante la actividad proteasa de una molécula de toxina no citotóxica.

35 **[0097]** El término “fragmento”, cuando se usa en relación a una proteína, significa un péptido que tiene al menos treinta y cinco, preferiblemente al menos veinticinco, más preferiblemente al menos veinte, y lo más preferiblemente al menos diez restos de aminoácido de la proteína en cuestión.

40 **[0098]** El término “variante”, cuando se usa en relación a una proteína, significa un péptido o fragmento de péptido de la proteína que contiene uno o más análogos de un aminoácido (por ejemplo, un aminoácido no natural), o un enlace sustituido.

45 **[0099]** El término “derivado”, cuando se usa en relación a una proteína, significa una proteína que comprende la proteína en cuestión, y una secuencia de péptido adicional. La secuencia de péptido adicional preferiblemente no debería interferir con el plegado básico, y por tanto, con la estructura conformacional de la proteína original. Dos o más péptidos (o fragmentos, o variantes) se pueden unir entre sí para formar un derivado. Alternativamente, un péptido (o fragmento, o variante) puede unirse a una molécula no relacionada (por ejemplo, un segundo péptido no relacionado). Los derivados se pueden sintetizar químicamente, pero se prepararán de forma típica por procedimientos de ácido nucleico recombinante. Se pueden incluir componentes adicionales tales como lípidos y/o polisacáridos, y/o policétidos.

50 **[0100]** En toda esta memoria descriptiva, la referencia al “receptor ORL₁” abarca todos los miembros de la familia del receptor ORL₁. Los miembros de la familia del receptor ORL₁ tienen típicamente siete estructuras de dominios transmembrana, y están acoplados a proteínas G de las familias G_i y G_o. Un procedimiento para determinar la actividad estimulante de proteína G de los ligandos del receptor ORL₁ se proporciona en el Ejemplo 12. Un procedimiento para medir la reducción en los niveles de AMPc celular tras la activación mediante ORL₁ se proporciona en el Ejemplo 11. Otra característica adicional de los miembros de la familia del receptor ORL₁ es que de forma típica son capaces de unirse a nociceptina (el ligando natural de ORL₁). Como ejemplo, todas las variantes de corte y empalme alternativo del receptor ORL₁ son miembros de la familia del receptor ORL₁.

60 **[0101]** El término no citotóxico significa que la molécula de proteasa en cuestión no mata la célula diana contra la que se ha dirigido.

- [0102] La proteasa de la presente invención abarca todas las proteasas no citotóxicas naturales que son capaces de escindir una o más proteínas del aparato de fusión exocítico de las células eucariotas.
- 5 [0103] La proteasa de la presente invención es preferiblemente una proteasa bacteriana (o fragmento de la misma). Más preferiblemente, la proteasa bacteriana se selecciona entre los géneros *Clostridium* o *Neisseria* (por ejemplo, una cadena L clostrídica, o una proteasa IgA neisserial preferiblemente procedente de *N. gonorrhoeae*).
- 10 [0104] La presente invención abarca también proteasas no citotóxicas modificadas, entre las que se incluyen secuencias de aminoácidos que no se encuentran en la naturaleza y/o restos de aminoácidos sintéticos, siempre que las proteasas modificadas sigan demostrando la actividad proteasa anteriormente mencionada.
- 15 [0105] La proteasa de la presente invención preferiblemente muestra una actividad serina o metaloproteasa (por ejemplo, una actividad endopeptidasa). La proteasa es preferiblemente específica de una proteína SNARE (por ejemplo, SNAP-25, sinaptobrevina/VAMP, o syntaxina).
- 20 [0106] Se hace mención particular de los dominios proteasa de las neurotoxinas, por ejemplo, los dominios proteasa de las neurotoxinas bacterianas. De esta forma, la presente invención abarca el uso de dominios de neurotoxina, que son naturales, pero también las versiones preparadas de forma recombinante de dichas neurotoxinas naturales.
- 25 [0107] Las neurotoxinas de ejemplo se producen por clostridios, y el término neurotoxina clostrídica abarca las neurotoxinas producidas por *C. tetani* (TeNT), y por los serotipos A-G de *C. botulinum* (BoNT), así como por las toxinas tipo BoNT estrechamente relacionadas producidas por *C. baratii* y *C. butyricum*. Las abreviaturas anteriormente mencionadas se usan en toda esta memoria descriptiva. Por ejemplo, la nomenclatura BoNT/A denota la fuente de neurotoxina como BoNT (serotipo A). Se aplica la nomenclatura correspondiente a otros serotipos de BoNT.
- 30 [0108] El término fragmento de cadena L significa un componente de la cadena L de una neurotoxina, dicho fragmento muestra una actividad metaloproteasa y es capaz de escindir proteolíticamente una proteína asociada a vesícula y/o membrana plasmática implicadas en la exocitosis celular.
- 35 [0109] Un dominio de translocación es una molécula que permite la translocación de una proteasa (o fragmento de la misma) en una célula diana de forma que se produce una expresión funcional de la actividad proteasa en el citosol de la célula diana. Se puede confirmar por uno cualquiera de los varios ensayos convencionales existentes si cualquier molécula (por ejemplo una proteína o péptido) tienen la función de translocación necesaria de la presente invención.
- 40 [0110] Por ejemplo, Shone C. (1987) describe un ensayo *in vitro* que emplea liposomas que se exponen a una molécula de prueba. La presencia de la función de translocación necesaria se confirma por la liberación desde los liposomas de K⁺ y/o NAD marcado, lo que se puede controlar fácilmente [consultar Shone C. (1987) Eur. J. Biochem; vol. 167(1): pp. 175-180].
- 45 [0111] Otro ejemplo se proporciona en Blaustein R. (1987), quien describe un ensayo *in vitro* sencillo que emplea membranas planas compuestas por una doble capa de fosfolípidos. Las membranas se exponen a una molécula de prueba y se confirma la función de translocación necesaria por un aumento en la conductancia a través de dichas membranas [consultar Blaustein (1987) FEBS Letts; vol. 226, nº 1: pp. 115-120].
- 50 [0112] Una metodología adicional para permitir evaluar la fusión de membrana y por tanto la identificación de dominios de translocación adecuados para usar en la presente invención se proporciona en Methods in Enzymology Vol 220 y 221, Membrane Fusion Techniques, Partes A y B, Academic Press 1993.
- 55 [0113] El dominio de translocación es preferiblemente capaz de formar poros permeables a iones en membranas lipídicas en condiciones de pH bajo. Se ha encontrado preferible utilizar solo aquellas porciones de la molécula de proteína capaces de formar poros en la membrana endosomal.
- [0114] El dominio de translocación puede obtenerse de una fuente de proteína microbiana, en particular de una fuente de proteína bacteriana o vírica. De este modo, en una realización, el dominio de translocación es un dominio translocante de una enzima, tal como una toxina bacteriana o una proteína vírica.
- 60 [0115] Está bien documentado que algunos dominios de las moléculas de toxinas bacterianas son capaces de formar dichos poros. Es también conocido que determinados dominios de translocación de proteínas de fusión de membrana expresados víricamente son capaces de formar dichos poros. Dichos dominios pueden emplearse en la presente invención.

[0116] El dominio de translocación puede tener origen clostrídico, más concretamente el dominio H_N (o un componente funcional del mismo). H_N significa una porción o fragmento de la cadena H de una neurotoxina clostrídica aproximadamente equivalente a la mitad aminoterminal de la cadena H, o el dominio correspondiente a dicho fragmento de la cadena H intacta. Se prefiere que la cadena H carezca sustancialmente de la función de unión natural del componente H_c de la cadena H. A este respecto, la función HC puede eliminarse por delección de la secuencia de aminoácidos H_c (tanto durante la síntesis del ADN como después de la síntesis por tratamiento con nucleasa o proteasa). Alternativamente, la función H_c se puede inactivar por tratamiento químico o biológico. De esta forma, la cadena H es preferiblemente incapaz de unirse al sitio de unión de una célula diana a la que se ha unido una neurotoxina clostrídica natural (es decir, una holotoxina).

[0117] En una realización, el dominio de translocación es un dominio H_N (o fragmento del mismo) de una neurotoxina clostrídica. Entre los ejemplos de dominios de translocación clostrídicos adecuados se incluyen:

- Neurotoxina botulínica de tipo A – restos de aminoácidos (449-871)
- Neurotoxina botulínica de tipo B – restos de aminoácidos (441-858)
- Neurotoxina botulínica de tipo C – restos de aminoácidos (442-866)
- Neurotoxina botulínica de tipo D – restos de aminoácidos (446-862)
- Neurotoxina botulínica de tipo E – restos de aminoácidos (423-845)
- Neurotoxina botulínica de tipo F – restos de aminoácidos (440-864)
- Neurotoxina botulínica de tipo G – restos de aminoácidos (442-863)
- Neurotoxina tetánica - restos de aminoácidos (458-879)

[0118] Para detalles adicionales de la base genética de la producción de *Clostridium botulinum* y *C. tetani*, se recomienda la consulta de Henderson y col. (1997) en *The Clostridia: Molecular Biology and Pathogenesis*, Academic Press.

[0119] El término H_N abarca también porciones naturales de la neurotoxina H_N, y porciones modificadas que tienen secuencias de aminoácidos que no se encuentran en la naturaleza y/o restos de aminoácidos sintéticos, siempre que las porciones H_N modificadas sigan demostrando la función de translocación anteriormente mencionada.

[0120] Alternativamente, el dominio de translocación puede tener origen no clostrídico (ver la Tabla 4). Entre los ejemplos de dominios de translocación no clostrídicos adecuados se incluyen, pero no se restringen a, el dominio de translocación de la toxina diftérica [O'Keefe y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1992) 89, 6202-6206; Silverman y col., J. Biol. Chem. (1993) 269, 22524-22532; y London, E. (1992) Biochem. Biophys. Acta., 1112, pp.25-51], el dominio de translocación de la exotocina de *Pseudomonas* tipo A [Prior y col. Biochemistry (1992) 31, 3555-3559], los dominios de translocación de la toxina del ántrax [Blanke y col. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1996) 93, 8437-8442], diferentes péptidos fusogénicos o hidrófobos de función translocante [Plank y col. J. Biol. Chem. (1994) 269, 12918-12924; y Wagner y col. (1992) PNAS, 89, pp. 7934-7938], y péptidos anfifílicos [Murata y col., (1992) Biochem., 31, pp.1986-1992]. El dominio de translocación puede imitar al dominio de translocación presente en una proteína natural, o puede incluir variaciones en los aminoácidos de forma que las variaciones no destruyan la capacidad translocante del dominio de translocación.

[0121] Ejemplos particulares de dominios de translocación adecuados para usar en la presente invención incluyen determinados dominios de translocación de proteínas de fusión de membrana expresadas víricamente. Por ejemplo, Wagner y col., (1992) y Murata y col. (1992) describen la función de translocación (es decir fusión de membrana y vesiculación) de numerosos péptidos fusogénicos y anfifílicos derivados de la región del extremo N de la hemaglutinina del virus de la gripe. Otras proteínas de fusión de membrana expresadas víricamente que tienen la actividad translocante deseada son un dominio translocante procedente de un péptido fusogénico del Virus del Bosque de Semliki (SFV), un dominio translocante de la glucoproteína G del virus de la estomatitis vesicular (VSV), un dominio translocante de la proteína F del virus SER y un dominio translocante de glucoproteína de la envoltura del virus Foamy. Las proteínas Aspíke víricamente codificadas tienen aplicación en el contexto de la presente invención, por ejemplo, la proteína E1 de SFV y la proteína G de VSV.

[0122] El uso de los dominios de translocación listados en la Tabla (a continuación) incluye el uso de las variantes de secuencia de los mismos. Una variante puede comprender una o más sustituciones conservadoras de ácidos nucleicos y/o delecciones o inserciones de ácidos nucleicos, con la condición de que la variante tenga la función translocante necesaria. Una variante puede también comprender una o más sustituciones de aminoácidos y/o delecciones o inserciones de aminoácido, con la condición de que la variante tenga la función translocante necesaria.

Fuente del dominio de translocación	Restos de aminoácidos	Referencias

Toxina diftérica	194-380	Silverman y col., 1994, J. Biol. Chem. 269, 22524-22532 London E., 1992, Biochem. Biophys. Acta., 1113, 25-51
Dominio II de exotoxina de pseudomonas	405-613	Prior y col., 1992, Biochemistry 31, 3555-3559 Kihara & Pastan, 1994, Bioconj Chem. 5, 532-538
Hemaglutinina del virus de la gripe	GLFGAIAGFIENGWE GMIDGWYG, y variantes de la misma	Plank y col., 1994, J. Biol. Chem. 269, 12918-12924 Wagner y col., 1992, PNAS, 89, 7934-7938 Murata y col., 1992, Biochemistry 31, 1986-1992
Proteína del virus fusogénico del bosque de Semliki	Dominio de translocación	Kielian y col., 1996, J Cell Biol. 134 (4), 863-872
Glucoproteína G del virus de la estomatitis vesicular	118-139	Yao y col., 2003, Virology 310(2), 319-332
Proteína F del virus SER	Dominio de translocación	Seth y col., 2003, J Virol 77(11) 6520-6527
Glucoproteína de la envuelta del virus Foamy	Dominio de translocación	Picard-Maureau y col., 2003, J Virol. 77(8), 4722-4730

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[0123]

- Figura 1 Purificación de una proteína de fusión LC/A-nociceptina-H_N/A
- 5 Figura 2 Purificación de una molécula comparativa de una proteína de fusión nociceptina-LC/A-H_N/A
- Figura 3 Purificación de una proteína de fusión LC/C-nociceptina-H_N/C
- Figura 4 Purificación de una proteína de fusión LC/A-met encefalina-H_N/A
- Figura 5 Comparación de la eficacia de enlace entre una proteína de fusión LC/A-nociceptina-H_N/A y una proteína de fusión nociceptina-LC/A-H_N/A
- 10 Figura 6 Actividad catalítica *in vitro* de una proteína de fusión LC/A-nociceptina-H_N/A
- Figura 7 Purificación de una proteína de fusión LC/A-nociceptina variante-H_N/A
- Figura 8 Comparación de la eficacia de enlace entre una proteína de fusión LC/A-nociceptina-H_N/A y una proteína de fusión nociceptina variante-LC/A-H_N/A
- Figura 9 Familia de la proteína de fusión LC/A-nociceptina-H_N/A expresada/purificada con producto(s)
- 15 separadores de longitud variable
- Figura 10 Inhibición de la liberación de SP y escisión de SNAP-25 mediante CPN-A
- Figura 11 Inhibición de la liberación de SP y escisión de SNAP-25 durante periodos de tiempo prolongados tras exposición de DRG a CPN-A
- Figura 12 Escisión de SNAP-25 mediante CPNv-A

	Figura 13	Escisión de SNAP-25 durante periodos de tiempo prolongados tras exposición de DRG a CPNv-A
	Figura 14	Desplazamiento mediado por la fusión CPNv-A de la unión de [³ H]-nociceptina
	Figura 15	Producto CPNv(Ek)-A expresado/purificado
5	Figura 16	Escisión de SNAP-25 mediante CPNv(Ek)-A
	Figura 17	Producto CPNv-C expresado/purificado
	Figura 18	Escisión de syntaxina mediante CPNv-C
	Figura 19	Eficacia de CPN-A en el modelo de alodinia aguda mecánicamente inducida por capsaicina
10	Figura 20	Eficacia de CPN-A en el modelo de neuropatía diabética periférica (dolor neuropático) inducida por estreptozonina (STZ)
	Figura 21	Eficacia de CPNv-A en el modelo de alodinia aguda mecánicamente inducida por capsaicina
	Figura 22	Producto LC/A-CPLE-H _N /A expresado/ purificado
15	Figura 23	Producto LC/A-CPBE-H _N /A expresado/ purificado
	Figura 24	Producto CPOP-A expresado/purificado
	Figura 25	Producto CPOPv-A expresado/purificado
	Figura 26	Escisión de SNAP-25 <i>in vitro</i> en un modelo de célula DRG
	Figura 27	CPNv-A-FXa-HT expresado/purificado (etiqueta his retirable)
20	Figura 28	Eficacia <i>in vitro</i> de las proteínas de fusión LC/A-nociceptina-HN/A con separadores de longitud variable, evaluada mediante ensayos de competición de ligando
	Figura 29	Eficacia <i>in vitro</i> de las proteínas de fusión LC/A-nociceptina-HN/A con separadores de longitud variable, evaluada mediante escisión de SNAP-25
25	[0124]	A continuación se describen las figuras con más detalle.

Figura 1 - Purificación de una proteína de fusión LC/A-nociceptina-H_N/A

[0125] Utilizando la metodología detallada en el Ejemplo 9, se purificó una proteína de fusión LC/A-nociceptina-H_N/A a partir de células de *E. coli* BL21. Brevemente, los productos solubles obtenidos tras la rotura celular se llevaron a una columna de captura por afinidad cargada con níquel. Las proteínas unidas se eluyeron con imidazol 100 mM, se trataron con Factor Xa para activar la proteína de fusión y retirar la etiqueta de la proteína de unión a maltosa (MBP), y a continuación se volvió a aplicar a una segunda columna de captura por afinidad cargada con níquel. Las muestras del procedimiento de purificación se evaluaron mediante SDS-PAGE (Panel A) y transferencia Western (Panel B). Se utilizó antisuero anti-nociceptina (obtenido de Abcam) como el anticuerpo primario para la transferencia Western. Se identificó el material purificado final en ausencia y presencia de agente reductor en las carrils marcadas respectivamente con [-] y [+].

Figura 2 - Purificación de una molécula comparativa de una proteína de fusión LC/A-nociceptina-H_N/A

[0126] Utilizando la metodología detallada en el Ejemplo 9, se purificó una proteína de fusión nociceptina-LC/A-H_N/A a partir de células de *E. coli* BL21. Brevemente, los productos solubles obtenidos tras la rotura celular se llevaron a una columna de captura por afinidad cargada con níquel. Las proteínas unidas se eluyeron con imidazol 100 mM, se trataron con Factor Xa para activar la proteína de fusión y retirar la etiqueta de la proteína de unión a maltosa (MBP), y a continuación se volvió a aplicar a una segunda columna de captura por afinidad cargada con níquel. Las muestras del procedimiento de purificación se evaluaron mediante SDS-PAGE (Panel A) y transferencia Western (Panel B). Se utilizó antisuero anti-nociceptina (obtenido de Abcam) como el anticuerpo primario para la transferencia Western. Se identificó el material purificado final en ausencia y presencia de agente reductor en las carrils marcadas respectivamente con [-] y [+].

Figura 3 - Purificación de una proteína de fusión LC/C-nociceptina-H_N/C

[0127] Utilizando la metodología detallada en el Ejemplo 9, se purificó una proteína de fusión LC/C-nociceptina-H_N/C a partir de células de *E. coli* BL21. Brevemente, los productos solubles obtenidos tras la rotura celular se llevaron a una columna de captura por afinidad cargada con níquel. Las proteínas unidas se eluyeron con imidazol 100 mM, se trataron con Factor Xa para activar la proteína de fusión y retirar la etiqueta de la proteína de unión a maltosa (MBP), y a continuación se volvió a aplicar a una segunda columna de captura por afinidad cargada con níquel. Las muestras del procedimiento de purificación se evaluaron mediante SDS-PAGE (Panel A) y transferencia Western (Panel B). Se utilizó antisuero anti-nociceptina (obtenido de Abcam) como el anticuerpo primario para la transferencia Western. Se identificó el material purificado final en ausencia y presencia de agente reductor en las carrils marcadas respectivamente con [-] y [+].

Figura 4 - Purificación de una proteína de fusión LC/A-met encefalina-H_N/A

[0128] Utilizando la metodología detallada en el Ejemplo 9, se purificó una proteína de fusión LC/A-met encefalina-H_N/A a partir de células de *E. coli* BL21. Brevemente, los productos solubles obtenidos tras la rotura celular se llevaron a una columna de captura por afinidad cargada con níquel. Las proteínas unidas se eluyeron con imidazol 100 mM, se trataron con Factor Xa para activar la proteína de fusión y retirar la etiqueta de la proteína de unión a maltosa (MBP), y a continuación se volvió a aplicar a una segunda columna de captura por afinidad cargada con níquel. Las muestras del procedimiento de purificación se evaluaron mediante SDS-PAGE. Se identificó el material purificado final en ausencia y presencia de agente reductor en las carrils marcadas respectivamente con [-] y [+].

10 **Figura 5 - Comparación de la eficacia de enlace entre una proteína de fusión LC/A-nociceptina-H_N/A y una proteína de fusión nociceptina-LC/A-H_N/A**

[0129] Se evaluó la capacidad de las fusiones de nociceptina para unirse al receptor ORL₁ mediante un ensayo sencillo basado en competición. Cultivos primarios de ganglio de la raíz dorsal (DRG) se expusieron a concentraciones variables de material de prueba en presencia de [³H]-nociceptina 1 nM. Se evaluó la reducción en la unión específica del ligando radiomarcado mediante recuento por centelleo, y se representó gráficamente en comparación con la eficacia del ligando marcado (nociceptina Tocris). Es evidente que la fusión LC/A- nociceptina-H_N/A es muy superior a la fusión nociceptina-LC/A-H_N/A respecto a su interacción con el receptor ORL₁.

20 **Figura 6 - Actividad catalítica *in vitro* de una proteína de fusión LC/A-nociceptina-H_N/A**

[0130] La actividad endopeptidasa *in vitro* de la proteína de fusión LC/A-nociceptina-H_N/A purificada se determinó esencialmente según se ha descrito en Chaddock y col. 2002, Prot. Express Purif. 25, 219-228. Brevemente, El péptido SNAP-25 inmovilizado en una placa ELISA se expuso a concentraciones variables de proteína de fusión durante 1 hora a 37°C. Tras una serie de lavados, se cuantificó el péptido SNAP-25 escindido por su reactividad frente a un antisuero específico.

25 **Figura 7 - Purificación de una proteína de fusión LC/A-nociceptina variante-H_N/A**

[0131] Utilizando la metodología detallada en el Ejemplo 9, se purificó una proteína de fusión LC/A-nociceptina variante-H_N/A a partir de células de *E. coli* BL21. Brevemente, los productos solubles obtenidos tras la rotura celular se llevaron a una columna de captura por afinidad cargada con níquel. Las proteínas unidas se eluyeron con imidazol 100 mM, se trataron con Factor Xa para activar la proteína de fusión y retirar la etiqueta de la proteína de unión a maltosa (MBP), y a continuación se volvió a aplicar a una segunda columna de captura por afinidad cargada con níquel. Las muestras del procedimiento de purificación se evaluaron mediante SDS-PAGE. Se identificó el material purificado final en ausencia y presencia de agente reductor en las carrils marcadas respectivamente con [-] y [+].

30 **Figura 8 - Comparación de la eficacia de enlace entre una proteína de fusión LC/A-nociceptina-H_N/A y una proteína de fusión nociceptina variante-LC/A-H_N/A**

[0132] Se evaluó la capacidad de las fusiones de nociceptina para unirse al receptor ORL₁ mediante un ensayo sencillo basado en competición. Cultivos primarios de ganglio de la raíz dorsal (DRG) se expusieron a concentraciones variables de material de prueba en presencia de [³H]-nociceptina 1 nM. Se evaluó la reducción en la unión específica del ligando radiomarcado mediante recuento por centelleo, y se representó gráficamente en comparación con la eficacia del ligando marcado (nociceptina Tocris). Es evidente que la fusión LC/A- nociceptina variante-H_N/A (CPNv-LHA) es muy superior a la fusión nociceptina-LC/A-H_N/A (CPN-LHA) respecto a su interacción con el receptor ORL₁.

40 **Figura 9 - Familia de la proteína de fusión LC/A-nociceptina-H_N/A expresada/purificada con producto(s) separadores de longitud variable**

[0133] Utilizando la metodología detallada en el Ejemplo 9, se purificaron variantes de la fusión LC/A-CPN-H_N/A consistentes en GS10, GS30 y HX27 a partir de una pasta de células de *E. coli*. Las muestras procedentes de la purificación de LC/A-CPN(GS10)-H_N/A, LC/A-CPN (GS15)-H_N/A, LC/A-CPN(GS25)-H_N/A, LC/A-CPN(GS30)-H_N/A y LC/A-CPN(HX27)-H_N/A se evaluaron mediante SDS-PAGE antes de teñirlas con azul de Coomassie. El perfil electroforético indica la purificación de una especie bicatenaria con unión disulfuro del peso molecular esperado de CPBE-A. Panel superior: M = marcadores de peso molecular de referencia; S = fracción total de proteína soluble de *E. coli*; FT = proteínas que no se unen a la columna de Sefarosa cargada con Ni²⁺; FUSION = proteína de fusión eluida por adición de imidazol. Panel inferior: Carril 1 = marcadores de peso molecular de referencia; Carril 2 = fracción total de proteína soluble de *E. coli*; Carril 3 = material purificado tras la captura inicial sobre Sefarosa cargada con Ni²⁺; Carril 4 = material tratado con Factor Xa antes de la captura final sobre Sefarosa; Carril 5 = material final purificado tras la activación con Factor Xa (5 μl); Carril 6 = material final purificado tras la activación con Factor Xa (10 μl); Carril 7 = material final purificado tras la activación con Factor Xa (20 μl); Carril 8 =

material final purificado tras la activación con Factor Xa + DTT (5 μ l); Carril 9 = material final purificado tras la activación con Factor Xa + DTT (10 μ l); Carril 10 = material final purificado tras la activación con Factor Xa + DTT (20 μ l).

5 **Figura 10 - Inhibición de la liberación de SP y escisión de of SNAP-25 mediante CPN-A**

10 **[0134]** Brevemente, cultivos primarios de ganglio de la raíz dorsal (DRG) se expusieron a concentraciones variables de CPN-A durante 24 horas. Las proteínas celulares se separaron mediante SDS-PAGE, se sometieron a transferencia Western, y se sondearon con un anticuerpo contra SNAP-25 para facilitar la evaluación de la escisión del SNAP-25. El porcentaje de SNAP-25 escindido se calculó mediante análisis densitométrico y se representó gráficamente contra la concentración de fusión (línea discontinua) También se recuperó material para un análisis del contenido en sustancia P mediante un kit EIA específico. La inhibición de la liberación de la sustancia P se muestra por la línea continua. La concentración de fusión necesaria para conseguir un 50% de la escisión máxima del SNAP-25 se estimó en $6,30 \pm 2,48$ nM.

15 **Figura 11 - Inhibición de la liberación de SP y escisión de of SNAP-25 durante periodos de tiempo prolongados tras exposición de DRG a CPN-A**

20 **[0135]** Cultivos primarios de ganglio de la raíz dorsal (DRG) se expusieron a concentraciones variables de CPN-A durante 24 horas. Se utilizó la toxina botulínica (BoNT/A) como control. Tras esta exposición inicial, el material extracelular se retiró por lavado, y las células se incubaron a 37°C durante periodos variables de tiempo. En los momentos temporales específicos, las proteínas celulares se separaron mediante SDS-PAGE, se sometieron a transferencia Western, y se sondearon con un anticuerpo contra SNAP-25 para facilitar la evaluación de la escisión del SNAP-25. El porcentaje de SNAP-25 escindido se calculó mediante análisis densitométrico y se ilustró mediante líneas discontinuas. También se recuperó material para un análisis del contenido en sustancia P mediante un kit EIA específico. La inhibición de la liberación de la sustancia P se muestra por las líneas continuas.

25 **Figura 12 - Escisión de SNAP-25 mediante CPNv-A**

30 **[0136]** Cultivos primarios de ganglio de la raíz dorsal (DRG) se expusieron a concentraciones variables de CPNv-A durante 24 horas. Las proteínas celulares se separaron mediante SDS-PAGE, se sometieron a transferencia Western, y se sondearon con un anticuerpo contra SNAP-25 para facilitar la evaluación de la escisión del SNAP-25. El porcentaje de SNAP-25 escindido se calculó mediante análisis densitométrico. La concentración de fusión necesaria para conseguir un 50% de la escisión máxima del SNAP-25 se estimó en $1,38 \pm 0,36$ nM.

35 **Figura 13 - Escisión de SNAP-25 durante periodos de tiempo prolongados tras exposición de DRG a CPNv-A**

40 **[0137]** Cultivos primarios de ganglio de la raíz dorsal (DRG) se expusieron a concentraciones variables de CPNv-A durante 24 horas. Se utilizó CPN-A como control. Tras esta exposición inicial, el material extracelular se retiró por lavado, y las células se incubaron a 37°C durante periodos variables de tiempo. En los momentos temporales específicos, las proteínas celulares se separaron mediante SDS-PAGE, se sometieron a transferencia Western, y se sondearon con un anticuerpo contra SNAP-25 para facilitar la evaluación de la escisión del SNAP-25. El porcentaje de SNAP-25 escindido se calculó mediante análisis densitométrico.

45 **Figura 14 - Desplazamiento mediado por la fusión CPNv-A de la unión de [³H]-nociceptina**

50 **[0138]** Se evaluó la capacidad de las fusiones de nociceptina para unirse al receptor ORL₁ mediante un ensayo sencillo basado en competición. Cultivos primarios de ganglio de la raíz dorsal (DRG) se expusieron a concentraciones variables de material de prueba en presencia de [³H]-nociceptina 1 nM. Se evaluó la reducción en la unión específica del ligando radiomarcado mediante recuento por centelleo, y se representó gráficamente en comparación con la eficacia del ligando marcado (nociceptina Tocris). Es evidente que la fusión LC/A-nociceptina variante-H_N/A (marcada como CPNv-LHnA) es muy superior a la fusión nociceptina-LC/A-H_N/A (marcada como CPN-LHnA) respecto a su interacción con el receptor ORL₁.

55 **Figura 15 - Producto CPNv(Ek)-A expresado/purificado**

60 **[0139]** Las proteínas se sometieron a SDS-PAGE antes de teñirlas con azul de Coomassie. El perfil electroforético indica la purificación de una especie bicatenaria con unión disulfuro del peso molecular esperado de CPNv(Ek)-A. Carril 1 = marcadores de peso molecular de referencia; Carril 2 = fracción total de proteína soluble de *E. coli*; Carril 3 = material purificado tras la captura inicial sobre Sefarosa cargada con Ni²⁺; Carril 4 = material final purificado tras la activación con enteroquinasa (5 μ l); Carril 5 = material final purificado tras la activación con enteroquinasa (10 μ l); Carril 6 = material final purificado tras la activación con enteroquinasa (20 μ l); Carril 7 = material final purificado tras la activación con enteroquinasa + DTT (5 μ l); Carril 8 = material final purificado tras la activación con enteroquinasa + DTT (10 μ l); Carril 9 = material final purificado tras la activación con enteroquinasa +

DTT (20 μ l).

Figura 16 - Escisión de SNAP-25 mediante CPNv(Ek)-A

5 **[0140]** Cultivos primarios de ganglio de la raíz dorsal (DRG) se expusieron a concentraciones variables de CPNv(Ek)-A durante 24 horas. Las proteínas celulares se separaron mediante SDS-PAGE, se sometieron a transferencia Western, y se sondearon con un anticuerpo contra SNAP-25 para facilitar la evaluación de la escisión del SNAP-25. El porcentaje de SNAP-25 escindido se calculó mediante análisis densitométrico. Se utilizó CPNv-A preparada como en el Ejemplo 9 a efectos de comparación. Se muestra el porcentaje de escisión del SNAP-25 mediante CPNv (Ek)-A (etiquetado como activado con En) y CPNv-A (etiquetado como activado con Xa).
10

Figura 17 - Producto CPNv-C expresado/purificado

15 **[0141]** Las proteínas se sometieron a SDS-PAGE antes de teñirlas con azul de Coomassie. El perfil electroforético indica la purificación de una especie bicatenaria con unión disulfuro del peso molecular esperado de CPNv-C. Carril 1 = marcadores de peso molecular de referencia; Carril 2 = fracción total de proteína soluble de *E. coli*; Carril 3 = material purificado tras la captura inicial sobre Sefarosa cargada con Ni²⁺; Carril 4 = material tratado con Factor Xa antes de la captura final sobre Sefarosa; Carril 5 = material purificado tras la segunda captura inicial sobre Sefarosa cargada con Ni²⁺; Carril 6 = material purificado fina; Carril 7 = material purificado final + DTT; Carril 8 = marcadores de peso molecular de referencia.
20

Figure 18 - Escisión de sintaxina mediante CPNv-C

25 **[0142]** Cultivos primarios de ganglio de la raíz dorsal (DRG) se expusieron a concentraciones variables de CPNv-C durante 24 horas. Las proteínas celulares se separaron mediante SDS-PAGE, se sometieron a transferencia Western, y se sondearon con un anticuerpo contra sintaxina para facilitar la evaluación de la escisión de la sintaxina. El porcentaje de sintaxina escindida se calculó mediante análisis densitométrico. La concentración de fusión necesaria para conseguir un 50% de la escisión máxima de sintaxina estimó en 3,13 \pm 1,96 nM.
30

Figura 19 - Eficacia de CPN-A en el modelo de alodinia aguda mecánicamente inducida por capsaicina

35 **[0143]** Se evaluó la capacidad de una fusión (CPN/A) para inhibir la alodinia mecánicamente inducida por capsaicina tras una inyección subcutánea intraplantar en la almohadilla de la pata trasera. Los animales de ensayo se evaluaron por la frecuencia de retirada de la pata trasera (PWF%) en respuesta a una serie de estímulos con un filamento Von Frey de 10 g (10 estímulos x 3 pruebas) antes de su alistamiento en el estudio (Pre-Treat); tras el tratamiento intraplantar subcutáneo con CPN/A pero antes de la capsaicina (Pre-CAP); y tras el estímulo con capsaicina tras la inyección de CPN/A (promedio de respuestas a 15' and 30'; CAP). El estímulo con capsaicina se consiguió por inyección de 10 μ l de una disolución al 0,3%. Se prepararon diluciones en serie en BSA al 0,5%/solución salina.
40

Figura 20 - Eficacia de CPN-A en el modelo de neuropatía diabética periférica (dolor neuropático) inducida por estreptozonina (STZ)

45 **[0144]** Se trataron ratas macho Sprague-Dawley (250-300 g) con 65 mg/kg de STZ en tampón citrato (I.V.) y se midieron semanalmente glucosa y lípidos en sangre para definir la adecuación del modelo. El umbral de retirada de la pata (PWT) se mide en respuesta a una serie de estímulos con un filamento Von Frey durante un periodo de tiempo. Se considera la alodinia establecida cuando el PWT en dos fechas de ensayo consecutivas (separadas por una semana) mide menos de 6 g en la escala. En este punto, las ratas se aleatorizaron bien a un grupo con solución salina (control de eficacia negativa), grupo de la gabapentina (control de eficacia positiva) o a un grupo de ensayo (CPN/A). Los materiales de ensayo (20-25 μ l) se inyectaron subcutáneamente en una sola inyección (excepto la gabapentina) y el PWT se midió 1 día después del tratamiento y periódicamente con posterioridad durante un periodo de 2 semanas. La gabapentina (30 mg/kg i.p. @ 3 ml/kg de volumen de inyección) se inyectó diariamente, 2 horas antes de la prueba de PWT.
50

Figura 21 - Eficacia de CPNv-A en el modelo de alodinia aguda mecánicamente inducida por capsaicina

55 **[0145]** Se evaluó la capacidad de una fusión LC/A-nociceptina variante-H_N/A (CPNv/A) para inhibir la alodinia mecánicamente inducida por capsaicina tras una inyección subcutánea intraplantar en la almohadilla de la pata trasera. Los animales de ensayo se evaluaron por la frecuencia de retirada de la pata trasera (PWF%) en respuesta a una serie de estímulos con un filamento Von Frey de 10 g (10 estímulos x 3 pruebas) antes de su alistamiento en el estudio (Pre-Treat), tras el tratamiento intraplantar subcutáneo con CPNv/A pero antes de la capsaicina (Pre-CAP); y tras el estímulo con capsaicina tras la inyección de CPNv/A (promedio de respuestas a 15' and 30'; CAP). El estímulo con capsaicina se consiguió por inyección de 10 μ l de una disolución al 0,3%. Se prepararon diluciones en serie en BSA al 0,5%/solución salina. Estos datos se expresan como el diferencial normalizado de la frecuencia de
60

retirada de la pata, en el que la diferencia entre los valores de la respuesta punta (post-capsaicina) y el de la respuesta inicial (pre-capsaicina) se expresan en forma de porcentaje. Con este análisis, puede verse que CPNv/A es más potente que CPN/A ya que se necesita una dosis inferior de CPNv/A para conseguir un efecto analgésico similar al visto con CPN/A.

5

Figura 22 - Producto LC/A-CPLE-H_N/A expresado/purificado

[0146] Las proteínas se sometieron a SDS-PAGE antes de teñirlas con azul de Coomassie. El perfil electroforético indica la purificación de una especie bicatenaria con unión disulfuro del peso molecular esperado de CPLE-A. Carril 1 = marcadores de peso molecular de referencia; Carril 2 = fracción total de proteína soluble de *E. coli*; Carril 3 = material purificado tras la captura inicial sobre Sefarosa cargada con Ni²⁺; Carril 4 = material tratado con Factor Xa antes de la captura final sobre Sefarosa; Carril 5 = material purificado tras la segunda captura inicial sobre Sefarosa cargada con Ni²⁺; Carril 6 = material purificado final; Carril 7 = material purificado final + DTT.

10

Figura 23 - Producto LC/A-CPBE-H_N/A expresado/purificado

[0147] Las proteínas se sometieron a SDS-PAGE antes de teñirlas con azul de Coomassie. El perfil electroforético indica la purificación de una especie bicatenaria con unión disulfuro del peso molecular esperado de CPBE-A. Carril 1 = fracción total de proteína soluble de *E. coli*; Carril 2 = material purificado tras la captura inicial sobre Sefarosa cargada con Ni²⁺; Carril 3 = material tratado con Factor Xa antes de la captura final sobre Sefarosa; Carril 4 = material final purificado tras la activación con Factor Xa (5 µl); Carril 5 = material final purificado tras la activación con Factor Xa (10 µl); Carril 6 = material final purificado tras la activación con Factor Xa (20 µl); Carril 7 = material final purificado tras la activación con Factor Xa + DTT (5 µl); Carril 8 = material final purificado tras la activación con Factor Xa + DTT (10 µl); Carril 9 = material final purificado tras la activación con Factor Xa + DTT (20 µl); Carril 10 = marcadores de peso molecular de referencia.

20

25

Figura 24 - Producto CPOP-A expresado/purificado

[0148] Las proteínas se sometieron a SDS-PAGE antes de teñirlas con azul de Coomassie. El perfil electroforético indica la purificación de una especie bicatenaria con unión disulfuro del peso molecular esperado de CPOP-A. Carril 1 = marcadores de peso molecular de referencia; Carril 2 = material purificado tras la captura inicial sobre Sefarosa cargada con Ni²⁺; Carril 3 = material tratado con Factor Xa antes de la captura final sobre Sefarosa; Carril 4 = material purificado tras la segunda captura inicial sobre Sefarosa cargada con Ni²⁺; Carril 5 = material final purificado tras la activación con Factor Xa (5 µl); Carril 6 = material final purificado tras la activación con Factor Xa (10 µl); Carril 7 = material final purificado tras la activación con Factor Xa (20 µl); Carril 8 = material final purificado tras la activación con Factor Xa + DTT (5 µl); Carril 9 = material final purificado tras la activación con Factor Xa + DTT (10 µl); Carril 10 = material final purificado tras la activación con Factor Xa + DTT (20 µl).

30

35

Figura 25 - Producto CPOPv-A expresado/purificado

[0149] Las proteínas se sometieron a SDS-PAGE antes de teñirlas con azul de Coomassie. El perfil electroforético indica la purificación de una especie bicatenaria con unión disulfuro del peso molecular esperado de CPOPv-A. Carril 1 = marcadores de peso molecular de referencia; Carril 2 = fracción total de proteína soluble de *E. coli*; Carril 3 = material purificado tras la captura inicial sobre Sefarosa cargada con Ni²⁺; Carril 4 = material tratado con Factor Xa antes de la captura final sobre Sefarosa; Carril 5 = material final purificado tras la activación con Factor Xa (5 µl); Carril 6 = material final purificado tras la activación con Factor Xa (10 µl); Carril 7 = material final purificado tras la activación con Factor Xa (20 µl); Carril 8 = material final purificado tras la activación con Factor Xa + DTT (5 µl); Carril 9 = material final purificado tras la activación con Factor Xa + DTT (10 µl); Carril 10 = material final purificado tras la activación con Factor Xa + DTT (20 µl).

40

45

50

Figura 26 - Escisión de SNAP-25 *in vitro* en un modelo de célula DRG

[0150] Cultivos primarios de ganglio de la raíz dorsal (DRG) se expusieron a concentraciones variables de GPOPv-A durante 24 horas. Las proteínas celulares se separaron mediante SDS-PAGE, se sometieron a transferencia Western, y se sondearon con un anticuerpo contra SNAP-25 para facilitar la evaluación de la escisión del SNAP-25. El porcentaje de SNAP-25 escindido se calculó mediante análisis densitométrico.

55

Figura 27 - CPNv-A-FXa-HT expresado/purificado (etiqueta his retirable)

[0151] Las proteínas se sometieron a SDS-PAGE antes de teñirlas con azul de Coomassie. El perfil electroforético indica la purificación de una especie bicatenaria con unión disulfuro del peso molecular esperado de CPNv-A-FXa-HT. Carril 1 = marcadores de peso molecular de referencia; Carril 2 = fracción total de proteína soluble de *E. coli*; Carril 3 = material tratado con Factor Xa antes de la captura final sobre Sefarosa; Carril 4 = material final purificado tras la activación con Factor Xa; Carril 5 = material final purificado tras la activación con Factor Xa + DTT.

60

Figura 28 - Eficacia *in vitro* de las proteínas de fusión LC/A-nociceptina-HN/A con separadores de longitud variable, evaluada mediante ensayos de competición de ligando

5 **[0152]** Se evaluó la capacidad de las fusiones de LC/A-nociceptina-HN/A con separadores de longitud variable para unirse al receptor ORL₁ mediante un ensayo sencillo basado en competición. Cultivos primarios de ganglio de la raíz dorsal (DRG) se expusieron a concentraciones variables de material de prueba en presencia de [³H]-nociceptina 1 nM. Se evaluó la reducción en la unión específica del ligando radiomarcado mediante recuento por centelleo, y se representó gráficamente en comparación con la eficacia del ligando marcado (nociceptina Tocris). El panel superior ilustra las características de desplazamiento de los separadores GS0, GS20, GS30 y Hx27 mientras que el panel inferior ilustra el desplazamiento conseguido con las proteínas de fusión separadas con GS10, GS15 y GS25. Se concluye que los separadores GS0 y GS30 son ineficaces, y que el GS10 es poco eficaz, en el desplazamiento de la nociceptina del receptor ORL₁.

Figura 29 - Eficacia *in vitro* de las proteínas de fusión LC/A-nociceptina-HN/A con separadores de longitud variable, evaluada mediante escisión de SNAP-25

20 **[0153]** Cultivos primarios de ganglio de la raíz dorsal (DRG) se expusieron a concentraciones variables de CPN-A (con separadores de longitud variable) durante 24 horas. Las proteínas celulares se separaron mediante SDS-PAGE, se sometieron a transferencia Western, y se sondearon con un anticuerpo contra SNAP-25 para facilitar la evaluación de la escisión del SNAP-25. El porcentaje de SNAP-25 escindido se calculó mediante análisis densitométricos. Las características del enlace poco eficaz de la proteína de fusión separada con GS10 (consultar la Figura 28) se reflejan en las concentraciones más elevadas de la fusión que son necesarias para conseguir la escisión del SNAP-25 intracelular. Las proteínas de fusión separadas con GS0 y GS30 fueron completamente ineficaces (no se muestran los datos). GS15, y las proteínas de fusión separadas con 20 y 25 tuvieron una eficacia similar.

SEQS. ID NO:

30 **[0154]**
 SEQ ID1 Secuencia de ADN de LC/A
 SEQ ID2 Secuencia de ADN de HN/A
 SEQ ID3 Secuencia de ADN de LC/B
 SEQ ID4 Secuencia de ADN de HN/B
 35 SEQ ID5 Secuencia de ADN de LC/C
 SEQ ID6 Secuencia de ADN de HN/C
 SEQ ID7 Secuencia de ADN del enlazante CPN-A
 SEQ ID8 Secuencia de ADN del enlazante A
 SEQ ID9 Secuencia de ADN de la inserción de nociceptina con presentación del extremo N
 40 SEQ ID10 Secuencia de ADN del enlazante CPN-C
 SEQ ID11 Secuencia de ADN del enlazante CPBE-A
 SEQ ID12 Secuencia de ADN del enlazante CPNvar-A
 SEQ ID13 Secuencia de ADN de la fusión LC/A-CPN-HN/A
 SEQ ID14 Secuencia de proteína de la fusión LC/A-CPN-HN/A
 45 SEQ ID15 Secuencia de ADN de la molécula fusión comparativa N-LC/A-HN/A
 SEQ ID16 Secuencia de proteína de la molécula fusión comparativa N-LC/A-HN/A
 SEQ ID17 Secuencia de ADN de la fusión LC/C-CPN-HN/C
 SEQ ID18 Secuencia de proteína de la fusión LC/C-CPN-HN/C
 SEQ ID19 Secuencia de ADN de la fusión LC/C-CPN-HN/C (enlazante A)
 50 SEQ ID20 Secuencia de proteína de la fusión LC/C-CPN-HN/C (enlazante A)
 SEQ ID21 Secuencia de ADN de la fusión LC/A-CPME-HN/A
 SEQ ID22 Secuencia de proteína de la fusión LC/A-CPME-HN/A
 SEQ ID23 Secuencia de ADN de la fusión LC/A-CPBE-HN/A
 SEQ ID24 Secuencia de proteína de la fusión LC/A-CPBE-HN/A
 55 SEQ ID25 Secuencia de ADN de la fusión LC/A-CPNV-HN/A
 SEQ ID26 Secuencia de proteína de la fusión LC/A-CPNV-HN/A
 SEQ ID27 Secuencia de ADN de la fusión LC/A-CPN[1-11]-HN/A
 SEQ ID28 Secuencia de proteína de la fusión LC/A-CPN[1-11]-HN/A
 SEQ ID29 Secuencia de ADN de la fusión LC/A-CPN[[Y10]1-11]-HN/A
 60 SEQ ID30 Secuencia de proteína de la fusión LC/A-CPN[[Y10]1-11]-HN/A
 SEQ ID31 Secuencia de ADN de la fusión LC/A-CPN[[Y11]1-11]-HN/A
 SEQ ID32 Secuencia de proteína de la fusión LC/A-CPN[[Y11]1-11]-HN/A
 SEQ ID33 Secuencia de ADN de la fusión LC/A-CPN[[Y14]1-17]-HN/A
 SEQ ID34 Secuencia de proteína de la fusión LC/A-CPN[[Y14]1-17]-HN/A

ES 2 547 546 T3

	SEQ ID35	Secuencia de ADN de la fusión LC/A-CPN[1-13]-HN/A
	SEQ ID36	Secuencia de proteína de la fusión LC/A-CPN[1-13]-HN/A
	SEQ ID37	Secuencia de ADN de CPN[1-17]
	SEQ ID38	Secuencia de proteína de CPN[1-17]
5	SEQ ID39	Secuencia de ADN de CPN[1-11]
	SEQ ID40	Secuencia de proteína de CPN[1-11]
	SEQ ID41	Secuencia de ADN de CPN[[Y10]1-11]
	SEQ ID42	Secuencia de proteína de CPN[[Y10]1-11]
	SEQ ID43	Secuencia de ADN de CPN[[Y11]1-11]
10	SEQ ID44	Secuencia de proteína de CPN[[Y11]1-11]
	SEQ ID45	Secuencia de ADN de CPN[[Y14]1-17]
	SEQ ID46	Secuencia de proteína de CPN[[Y14]1-17]
	SEQ ID47	Secuencia de ADN de CPN[1-13]
	SEQ ID48	Secuencia de proteína de CPN[1-13]
15	SEQ ID49	Secuencia de ADN de CPNv (también conocida como N[[R14K15]1-17])
	SEQ ID50	Secuencia de proteína de CPNv (también conocida como N[[R14K15]1-17])
	SEQ ID51	Secuencia de ADN de la molécula fusión comparativa nociceptina-separador-LC/A-H _N /A
	SEQ ID52	Secuencia de proteína de la molécula fusión comparativa nociceptina-separador-LC/A-H _N /A
	SEQ ID53	Secuencia de ADN del enlazante CPN-A GS10
20	SEQ ID54	Secuencia de ADN del enlazante CPN-A GS15
	SEQ ID55	Secuencia de ADN del enlazante CPN-A GS25
	SEQ ID56	Secuencia de ADN del enlazante CPN-A GS30
	SEQ ID57	Secuencia de ADN del enlazante CPN-A HX27
	SEQ ID58	Secuencia de ADN de la fusión LC/A-CPN(GS15)-H _N /A
25	SEQ ID59	Secuencia de proteína de la fusión LC/A-CPN(GS15)-H _N /A
	SEQ ID60	Secuencia de ADN de la fusión LC/A-CPN(GS25)-H _N /A
	SEQ ID61	Secuencia de proteína de la fusión LC/A-CPN(GS25)-H _N /A
	SEQ ID62	Secuencia de ADN del enlazante CPNvar-A activable mediante enteroquinasa
	SEQ ID63	Secuencia de ADN de la fusión LC/A-CPNv(Ek)-H _N /A
30	SEQ ID64	Secuencia de proteína de la fusión LC/A-CPNv(Ek)-H _N /A
	SEQ ID65	Secuencia de ADN del enlazante CPNvar-A
	SEQ ID66	Secuencia de ADN de la fusión LC/C-CPNv-H _N /C (act. A)
	SEQ ID67	Secuencia de proteína de la fusión LC/C-CPNv-H _N /C (act. A)
35	SEQ ID68	Secuencia de ADN de la fusión LC/A-CPLE-H _N /A
	SEQ ID69	Secuencia de proteína de la fusión LC/A-CPLE-H _N /A
	SEQ ID70	Secuencia de ADN de la fusión LC/A-CPOP-H _N /A
	SEQ ID71	Secuencia de proteína de la fusión LC/A-CPOP-H _N /A
	SEQ ID72	Secuencia de ADN de la fusión LC/A-CPOPv-H _N /A
	SEQ ID73	Secuencia de proteína de la fusión LC/A-CPOPv-H _N /A
40	SEQ ID74	Secuencia de ADN de la proteasa IgA
	SEQ ID75	Secuencia de ADN de la fusión IgA-CPNv-H _N /A
	SEQ ID76	Secuencia de proteína de la fusión IgA-CPNv-H _N /A
	SEQ ID77	Secuencia de ADN de FXa-HT
	SEQ ID78	Secuencia de ADN de CPNv-A-FXa-HT
45	SEQ ID79	Secuencia proteína de la fusión CPNv-A-FXa-HT
	SEQ ID80	Secuencia de ADN del dominio de translocación DT
	SEQ ID81	Secuencia de ADN de CPLE-DT-A
	SEQ ID82	Secuencia de proteína de la fusión CPLE-DT-A
	SEQ ID83	Secuencia de ADN de TeNT LC
50	SEQ ID84	Secuencia de ADN de CPNv-TeNT LC
	SEQ ID85	Secuencia de proteína de la fusión CPNV-TeNT LC
	SEQ ID86	Secuencia de ADN del enlazante CPNvar-C
	SEQ ID87	Secuencia de ADN de la fusión LC/C-CPNv-H _N /C (act. C)
55	SEQ ID88	Secuencia de proteína de la fusión LC/C-CPNv-H _N /C (act. C)

EJEMPLOS:

Ejemplo 1 – Preparación de clones de estructura LC/A y H_N/A

60 **[0155]** El siguiente procedimiento crea los fragmentos LC y H_N para utilizar como el componente estructural para la expresión de la fusión multidominio. Este ejemplo se basa en la preparación de un clon basado en el serotipo A (SEQ ID1 y SEQ ID2), mediante procedimientos y metodología son igualmente aplicables al resto de serotipos [ilustrados por el listado de secuencias del serotipo B (SEQ ID3 y SEQ ID4) y el serotipo C (SEQ ID5 y SEQ ID6)].

Preparación de vectores de clonación y expresión

[0156] El pCR 4 (Invitrogen) es el vector de clonación estandarizado elegido, seleccionado debido a la falta de secuencias de restricción dentro del vector y sitios de secuenciación del cebador para una confirmación sencilla de la construcción. El vector de expresión está basado en el vector de expresión pMAL (NEB), que tiene las secuencias de restricción deseadas contenidas en el sitio de multiclonación en la orientación correcta para la inserción de la construcción (*Bam*HI-*Sal*I-*Pst*I-*Hind*III). Se ha retirado un fragmento del vector de expresión para crear un plásmido no movilizable y se han insertado una variedad de diferentes etiquetas de fusión para aumentar las posibilidades de purificación.

Preparación de la inserción de proteasa (por ejemplo LC/A)

El LC/A (SEQ ID1) se crea mediante una de dos formas:

[0157] La secuencia de ADN se diseñó mediante traducción inversa de la secuencia de aminoácidos LC/A [obtenida a partir de fuentes de datos de acceso libre tales como GenBank (número de acceso P10845) o (locus de acceso BXA1_CLOBO) usando una de las diferentes herramientas informáticas de traducción inversa (por ejemplo EditSeq que es la mejor para traducción inversa de *E. coli* (DNASTAR Inc.), o la herramienta Backtranslation v2.0 (Entelechon)]. Las secuencias de reconocimiento *Bam*HI/*Sal*I se incorporan a los extremos 5' y 3' respectivamente de la secuencia, manteniendo el marco de lectura correcto. La secuencia de ADN se criba (usando un programa informático como MapDraw, DNASTAR Inc.) en busca de las secuencias de restricción de escisión enzimática incorporadas durante la traducción inversa. Cualquier secuencia encontrada común con respecto a las requeridas por el sistema de clonación se eliminaron manualmente de la secuencia de clonación propuesta asegurando que se mantiene el uso común del codón de *E. coli*. El uso del codón de *E. coli* se evalúa mediante referencia a programas informáticos tales como Graphical Codon Usage Analyser (Geneart), y la relación entre el contenido en% de GC y el uso del codón se evalúa por referencia a las tablas publicadas de uso de codón (por ejemplo, la edición GenBank 143, 13 de septiembre de 2004). Esta secuencia de ADN optimizada que contiene el marco de lectura abierto (ORF) LC/A se sintetiza comercialmente con posterioridad (por ejemplo por Entelechon, Geneart o Sigma-Genosys) y se proporciona al vector pCR 4.

[0158] El procedimiento alternativo es usar amplificación mediante PCR de una secuencia de ADN existente con las secuencias de las enzimas de restricción *Bam*HI y *Sal*I incorporadas a los cebadores 5' y 3' de la PCR. Se sintetizaron cebadores oligonucleótidos complementarios procedentes de un proveedor (por ejemplo MWG o Sigma-Genosys), de forma que cada par tiene la capacidad de hibridarse con la hebra opuesta (los extremos 3' apuntan "uno hacia el otro") flanqueando la extensión del ADN diana de *Clostridium*, un oligonucleótido para cada hebra de ADN. Para generar un producto de la PCR, el par de cebadores oligonucleótidos cortos específicos de la secuencia de ADN de *Clostridium* se mezclan con la plantilla de ADN de *Clostridium* y otros componentes de reacción y se colocan en una máquina (la 'máquina de la PCR') de forma que se pueda cambiar automáticamente la temperatura de incubación del tubo de reacción, con ciclos entre aproximadamente 94°C (para desnaturalización), 55°C (para hibridación del oligonucleótido), y 72°C (para síntesis). Otros reactivos necesarios para la amplificación de un producto de la PCR incluyen una ADN polimerasa (como una polimerasa *Taq* o *Pfu*), cada uno de los cuatro bloques de ADN para construcción de nucleótidos en cantidades equimolares (50-200 µM) y un tampón adecuado para la enzima optimizado para una concentración de Mg²⁺ (0,5-5 mM).

[0159] El producto de la amplificación se clona en pCR 4 usando cualquiera de, clonación TOPO TA para productos PCR *Taq* o clonación Zero Blunt TOPO para productos PCR *Pfu* (ambos kits están comercializados por Invitrogen). El clon resultante se verifica por secuenciación. Cualquier secuencia de restricción adicional que no sea compatible con el sistema de clonación se elimina a continuación usando mutagénesis sitiodirigida [por ejemplo, usando Quickchange (Stratagene Inc.)].

Preparación de la inserción de proteasa (por ejemplo HN)

El HN/A (SEQ ID2) se crea mediante una de dos formas:

[0160] La secuencia de ADN se diseñó mediante traducción inversa de la secuencia de aminoácidos HN/A [obtenida a partir de fuentes de datos de acceso libre tales como GenBank (número de acceso P10845) o (locus de acceso BXA1_CLOBO)] usando una de las diferentes herramientas informáticas de traducción inversa [por ejemplo EditSeq que es la mejor para traducción inversa de *E. coli* (DNASTAR Inc.), o la herramienta Backtranslation v2.0 (Entelechon)]. Una secuencia de restricción *Pst*I agregada al extremo N y el *Xba*I-codón de detención-*Hind*III al extremo C asegurando que se mantiene el marco de lectura correcto. La secuencia de ADN se criba (usando un programa informático como MapDraw, DNASTAR Inc.) en busca de las secuencias de restricción de escisión enzimática incorporadas durante la traducción inversa. Cualquier secuencia encontrada común con respecto a las requeridas por el sistema de clonación se eliminaron manualmente de la secuencia de clonación propuesta asegurando que se mantiene el uso común del codón de *E. coli*. El uso del codón de *E. coli* se evalúa mediante

referencia a programas informáticos tales como Graphical Codon Usage Analyser (Geneart), y la relación entre el contenido en % de GC y el uso del codón se evalúa por referencia a las tablas publicadas de uso de codón (por ejemplo, la edición GenBank 143, 13 de septiembre de 2004). Esta secuencia de ADN optimizada se sintetiza comercialmente con posterioridad (por ejemplo por Entelechon, Geneart o Sigma-Genosys) y se proporciona al vector pCR 4.

[0161] El procedimiento alternativo es usar amplificación mediante PCR de una secuencia de ADN existente con las secuencias de las enzimas de restricción *Pst*I and *Xba*I-codón de detención-*Hind*III incorporadas a los cebadores 5' y 3' de la PCR. La amplificación mediante PCR se lleva a cabo como se ha descrito anteriormente. El producto de la PCR se insertó en el vector pCR 4 y se comprobó la secuenciación. Cualquier secuencia de restricción adicional que no sea compatible con el sistema de clonación se elimina a continuación usando mutagénesis sitiodirigida [por ejemplo usando Quickchange (Stratagene Inc.)].

Ejemplo 2 - Preparación de una proteína de fusión LC/A-nociceptina-H_N/A (nociceptina se encuentra en el extremo N de la cadena H_N)

Preparación de la inserción enlazante-nociceptina-separador

[0162] El enlazante LC-H_N se puede diseñar desde el principio, usando la información existente de la secuencia del enlazante como plantilla. Por ejemplo, el enlazante de serotipo A (definido en este caso como la región interdominio del polipéptido que se encuentra entre las cisteínas del puente disulfuro entre LC y H_N) de 23 aminoácidos de longitud y que tiene la secuencia VRGIITSKTKSLDKGYNKALNDL. En esta secuencia, se entiende que la activación de naturaleza proteolítica lleva a un dominio H_N que tiene un extremo N de la secuencia ALNDL. Esta información de secuencia es de libre disposición a partir de fuentes de bases de datos tales como GenBank (número de acceso P10845) o Swissprot (locus de acceso BXA1_CLOBO)]. A este enlazante se incorpora un sitio de Factor Xa, nociceptina y separador, y usando una de las diferentes herramientas informáticas de traducción inversa [por ejemplo EditSeq que es la mejor para traducción inversa de *E. coli* (DNASTAR Inc.), o la herramienta Backtranslation v2.0 (Entelechon)], se determina la secuencia de ADN que codifica la región enlazante-ligando-separador. A continuación, se incorporan sitios de restricción a la secuencia de ADN y se puede disponer como *Bam*HI-*Sa*II-enlazante-sitio de la proteasa-nociceptina-*Nhe*I-separador-*Spe*I-*Pst*I-*Xba*I-codón de detención-*Hind*III (SEQ ID7). Es importante asegurar que se mantiene el marco de lectura correcto para el separador, la nociceptina y las secuencias de restricción y que la secuencia *Xba*I no va precedida por las bases, TC, lo que daría por resultado la metilación en DAM. La secuencia de ADN se criba para determinar la incorporación de la secuencia de restricción, y cualquier secuencia encontrada común con respecto a las requeridas por el sistema de clonación se eliminaron manualmente de la secuencia de clonación propuesta asegurando que se mantiene el uso común del codón de *E. coli*. El uso del codón de *E. coli* se evalúa mediante referencia a programas informáticos tales como Graphical Codon Usage Analyser (Geneart), y la relación entre el contenido en % de GC y el uso del codón se evalúa por referencia a las tablas publicadas de uso de codón (por ejemplo, la edición GenBank 143, 13 de septiembre de 2004). Esta secuencia de ADN optimizada se sintetiza comercialmente con posterioridad (por ejemplo por Entelechon, Geneart o Sigma-Genosys) y se proporciona al vector pCR 4.

Preparación de la fusión LC/A-nociceptina-H_N/A

[0163] Para crear la construcción LC-enlazante-nociceptina-separador-H_N (SEQ ID13), el vector pCR 4 que codifica el enlazante (SEQ ID7) se escinde con las enzimas de restricción *Bam*HI + *Sa*II. Este vector escindido sirve a continuación como el vector receptor para la inserción y ligadura del ADN de LC/A (SEQ ID1) escindido con *Bam*HI + *Sa*II. El plásmido de ADN resultante se escinde a continuación con las enzimas de restricción *Pst*I + *Xba*I y sirve como el vector receptor para la inserción y ligadura del ADN H_N/A DNA (SEQ ID2) escindido con *Pst*I + *Xba*I. La construcción final contiene el LC-enlazante-nociceptina-separador-H_N ORF (SEQ ID13) para transferir a los vectores para expresión que de por resultado una proteína de fusión de la secuencia ilustrada en la SEQ ID14.

Ejemplo 3 - Preparación de una molécula comparativa de proteína de fusión LC/A-nociceptina-H_N/A (nociceptina se encuentra en el extremo N de la cadena LC)

[0164] La estructura LC/A-H_N/A se construye como se ha descrito en el Ejemplo 2 usando el enlazante de serotipo A sintetizado con la adición de un sitio del Factor Xa para la activación, dispuesto como *Bam*HI-*Sa*II-enlazante-sitio de la proteasa-enlazante-*Pst*I-*Xba*I-codón de detención-*Hind*III (SEQ ID8). La estructura LC/A-H_N/A y la inserción de nociceptina con presentación en el extremo N sintetizada (SEQ ID9) se escindieron con las enzimas de restricción *Bam*HI + *Hind*III, se purificaron en gel y se unieron entre sí para crear un nociceptina-separador-LC-enlazante-HN. El ORF (SEQ ID15) se corta a continuación con las enzimas de restricción *Ava*I + *Xba*I para transferencia a los vectores para expresión que de por resultado una proteína de fusión de la secuencia ilustrada en la SEQ ID16.

Ejemplo 4 - Purificación de una proteína de fusión LC/C-nociceptina-H_N/C

[0165] Siguiendo los procedimientos utilizados en los Ejemplos 1 y 2, se crearon LC/C (SEQ ID5) y H_N/C (SEQ ID6) y se insertaron en el enlazante de serotipo C dispuestos como *Bam*HI-*Sa*II-enlazante-sitio de la proteasa-nociceptina-*Nhe*I-separador-*Spe*I-*Pst*I-*Xba*I-codón de detención-*Hind*III (SEQ ID10). La construcción final contiene el LC-enlazante-nociceptina-separador-H_N ORF (SEQ ID17) para expresión como proteína de la secuencia ilustrada en la SEQ ID18.

Ejemplo 5 – Preparación de una proteína de fusión LC/C-nociceptina-H_N/C con una secuencia de activación de serotipo A

[0166] Siguiendo los procedimientos utilizados en los Ejemplos 1 y 2, se crearon LC/C (SEQ ID5) y H_N/C (SEQ ID6) y se insertaron en el enlazante de serotipo A dispuestos como *Bam*HI-*Sa*II-enlazante-sitio de la proteasa-nociceptina-*Nhe*I-separador-*Spe*I-*Pst*I-*Xba*I-codón de detención-*Hind*III (SEQ ID7). La construcción final contiene el LC-enlazante-nociceptina-separador-H_N ORF (SEQ ID19) para expresión como proteína de la secuencia ilustrada en la SEQ ID20.

Ejemplo 6 - Preparación de una proteína de fusión LC/A-met encefalina-H_N/A

[0167] Debido al pequeño tamaño, de cinco aminoácidos, del ligando met-encefalina, se creó la fusión LC/A-met encefalina-H_N/A mediante mutagénesis sitodirigida [por ejemplo mediante Quickchange (Stratagene Inc.)] usando la fusión LC/A-nociceptina-H_N/A (SEQ ID13) como plantilla. Se diseñaron oligonucleótidos que codificaban el péptido YGGFM de la met-encefalina, asegurando el mantenimiento del uso convencional del codón de *E. coli* y la no incorporación de sitios de restricción adicionales, flanqueado por secuencias complementarias de la región enlazante de la fusión LC/A-nociceptina-H_N/A (SEQ ID13) en cualquiera de los lados de la sección de la nociceptina. El producto SDM se comprueba por secuenciación, y la construcción final que contiene el LC-enlazante-met encefalina-separador-H_N ORF (SEQ ID21) para expresión como proteína de la secuencia se ilustra en la SEQ ID22.

Ejemplo 7 - Preparación de una proteína de fusión LC/A-β endorfina-H_N/A

[0168] Siguiendo los procedimientos utilizados en los Ejemplos 1 y 2, se crearon LC/A (SEQ ID1) y H_N/A (SEQ ID2) y se insertaron en el enlazante de β endorfina serotipo A dispuestos como *Bam*HI-*Sa*II-enlazante-sitio de la proteasa-β endorfina-*Nhe*I-separador-*Spe*I-*Pst*I-*Xba*I-codón de detención-*Hind*III (SEQ ID11). La construcción final contiene el LC-enlazante-β endorfina -separador-H_N ORF (SEQ ID23) para expresión como proteína de la secuencia ilustrada en la SEQ ID24.

Ejemplo 8 - Preparación de una proteína de fusión LC/A-nociceptina variante-H_N/A

[0169] Siguiendo los procedimientos utilizados en los Ejemplos 1 y 2, se crearon LC/A (SEQ ID1) y H_N/A (SEQ ID2) y se insertaron en el enlazante de nociceptina variante serotipo A dispuestos como *Bam*HI-*Sa*II-enlazante-sitio de la proteasa-nociceptina variante-*Nhe*I-separador-*Spe*I-*Pst*I-*Xba*I-codón de detención-*Hind*III (SEQ ID12). La construcción final contiene el LC-enlazante-nociceptina variante -separador-H_N ORF (SEQ ID25) para expresión como proteína de la secuencia ilustrada en la SEQ ID26.

Ejemplo 9 – Procedimiento de purificación de una proteína de fusión LC/A-nociceptina-H_N/A

[0170] Descongelar un tubo falcon que contiene 25 ml de HEPES 50 mM pH 7,2, NaCl 200 mM y aproximadamente 10 g de pasta de células de *E. coli* BL21. Llevar la pasta descongelada de células hasta 80 ml con HEPES 50 mM pH 7,2, NaCl 200 mM y sonicar sobre hielo durante 30 segundos conectado, 30 segundos desconectado durante 10 ciclos con una potencia de 22 micrómetros comprobando que la muestra permanece fría. Centrifugar las células lisadas a 18.000 rpm, 4°C durante 30 minutos. Cargar el sobrenadante en una columna quelante cargada con NiSO₄ 0,1 M (20-30 ml de columna es suficiente) equilibrada con HEPES 50 mM pH 7,2, NaCl 200 mM. Utilizando un gradiente por etapas de imidazol 10 a 40 mM, eliminar por lavado la proteína no unida específicamente y eluir la proteína de fusión con imidazol 100 mM. Dializar la proteína de fusión eluida contra 5 l de HEPES 50 mM pH 7,2, NaCl 200 mM a 4°C durante toda la noche y medir la DO de la proteína de fusión dializada. Añadir 1 unidad de factor Xa por 100 μg de proteína de fusión e incubar a 25°C en estática durante toda la noche. Cargar en una columna quelante cargada con NiSO₄ 0,1 M (20-30 ml de columna es suficiente equilibrada con HEPES 50 mM pH 7,2, NaCl 200 mM). Lavar la columna hasta el valor inicial con HEPES 50 mM pH 7,2, NaCl 200 mM. Utilizando un gradiente por etapas de imidazol 10 a 40 mM, eliminar por lavado la proteína no unida específicamente y eluir la proteína de fusión con imidazol 100 mM. Dializar la proteína de fusión eluida contra 5 l de HEPES 50 mM pH 7,2, NaCl 200 mM a 4°C durante toda la noche y concentrar la fusión hasta aproximadamente 2 mg/ml, tomar una alícuota y congelar hasta -20°C. Ensayar la proteína purificada con evaluaciones de DO, BCA, análisis de pureza y SNAP-25.

Ejemplo 10 – Confirmación de la actividad agonista de TM por medida de la liberación de sustancia P desde

cultivos de células neuronales*Materiales*

5

[0171] La sustancia P EIA se obtiene de R&D Systems, Reino Unido.

Procedimientos

10

[0172] Se establecieron cultivos neuronales primarios de eDRG como se ha descrito anteriormente (Duggan y col., 2002). Se evaluó mediante EIA la liberación de sustancia P desde los cultivos, esencialmente como se ha descrito anteriormente (Duggan y col., 2002). El TM de interés se añade a los cultivos neuronales (establecidos durante al menos 2 semanas antes del tratamiento); se realizaron cultivos de control en paralelo por adición de vehículo en lugar de TM. Se obtuvo la liberación de sustancia P estimulada (KCl 100 mM) e inicial, junto con el contenido total de lisado celular, para los cultivos tanto de control como tratados con TM. Se midió la inmunorreactividad de la sustancia P usando los kits Substance P Enzyme Immunoassay (Cayman Chemical Company, USA o de R&D Systems, Reino Unido) según las instrucciones de los fabricantes.

15

20

[0173] La cantidad de sustancia P liberada por las células neuronales en presencia del TM de interés se compara con la liberación obtenida en presencia y en ausencia de KCl 100 mM. La estimulación de la liberación de sustancia P por el TM de interés por encima de la liberación inicial establece si el TM de interés es un "ligando agonista" según se ha definido en esta memoria descriptiva. Si se desea, la estimulación de la liberación de sustancia P por el TM de interés se puede comparar con una curva patrón de liberación de sustancia P producida usando el ligando natural del receptor ORL₁, la nociceptina (Tocris).

25

Ejemplo 11 – Confirmación de la activación del receptor ORL₁ por medida de la producción de AMPc estimulada por forskolina

30

[0174] La confirmación de que un TM dado actúa mediante el receptor ORL₁ se consigue mediante la siguiente prueba, en la que se evalúa la capacidad de los TM para inhibir la producción de AMPc estimulada por forskolina.

Materiales

35

[0175] [³H]adenina y [¹⁴C]AMPc se obtuvieron de GE Healthcare

Procedimientos

40

[0176] La prueba se lleva a cabo esencialmente como se ha descrito anteriormente en Meunier y col. [Isolation and structure of the endogenous agonist of opioid receptor-like ORL₁ receptor. Nature 377: 532-535, 1995] en células CHO intactas transfectadas en placas de plástico de 24 pocillos.

45

[0177] Se añadió a las células [³H]adenina (1,0 □Ci) en 0,4 ml de medio de cultivo. Las células permanecieron a 37°C durante 2 h para permitir la incorporación de la adenina a la combinación de ATP intracelular. Tras 2 h, las células se lavaron una vez con tampón de incubación que contenía: NaCl 130 mM, KCl 4,8 mM, KH₂PO₄ 1,2 mM, CaCl₂ 1,3 mM, MgSO₄ 1,2 mM, glucosa 10 mM, 1 mg/ml de albúmina de suero bovino y HEPES 25 mM pH 7,4, y se sustituyó por tampón que contenía forskolina (10 □M) e isobutil-metilxantina (50 □M) con o sin el TM de interés. Tras 10 min, el medio se aspiró y se sustituyó por 0,5 ml de HCl 0,2 M. Se añadieron aproximadamente 1000 cpm de [¹⁴C]AMPc a cada pocillo y se utilizaron como patrón interno. El contenido de los pocillos se transfirió a continuación a columnas de 0,65 g de alúmina en polvo seca. Las columnas se eluyeron con 4 ml de HCl 5 mM, 0,5 ml de acetato amónico 0,1 M, y seguidamente dos milímetros adicionales de acetato amónico. El eluato final se recogió en viales de centelleo, y se contó el ¹⁴C y el tritio. Las cantidades recogidas se corrigieron según la recuperación de [¹⁴C]AMPc. Los TM que son agonistas del receptor ORL₁ producen una reducción en el nivel de AMPc producido en respuesta a la forskolina.

55

Ejemplo 12 – Confirmación de la activación del receptor ORL₁ usando un ensayo de unión funcional con GTPγS

60

[0178] También se consigue confirmación de que un TM dado actúa mediante el receptor ORL₁ mediante el siguiente ensayo, una prueba de unión funcional con GTPγS.

Materiales

[0179] [³⁵S]GTPγS se obtuvo a partir de GE Healthcare
Las perlas de germen de trigo revestidas con aglutinina se obtuvieron de GE Healthcare

Procedimientos

5 [0180] Este ensayo se lleva a cabo esencialmente como se ha descrito en Traynor y Nahorski [Modulation by μ -opioid agonists of guanosine-5-O-(3-[³⁵S]thio)triphosphate binding to membranes from human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Mol. Pharmacol.* 47: 848-854, 1995].

10 [0181] Las células se rascaron a partir de cultivos de tejido en HEPES 20 mM, ácido etilendiaminotetraacético 1 mM, y centrifugado a continuación a 500 g durante 10 min. Las células se volvieron a suspender en este tampón y se homogeneizaron en un Polytron Homogenizer.

15 [0182] El homogenado se centrifugó a 27.000 g durante 15 min, y el residuo se volvió a suspender en tampón A, que contenía: HEPES 20 mM, MgCl₂ 10 mM, NaCl 100 mM, pH 7,4. La suspensión se volvió a centrifugar a 20.000 g y se suspendió una vez más en tampón A. Para el ensayo de unión, las membranas (8-15 \square g de proteína) se incubaron con [³⁵S]GTP S (50 pM), GDP (10 \square M), con o sin el TM de interés, en un volumen total de 1,0 ml, durante 60 min a 25°C. Las muestras se filtraron en placas de fibra de vidrio y se contaron como se ha descrito en los ensayos de unión.

20 **Ejemplo 13 - Preparación de una proteína de fusión LC/A-nociceptina-H_N/A (nociceptina se encuentra en el extremo N de la cadena H_N)**

[0183] La inserción enlazante-nociceptina-separador se prepara como se ha descrito en el Ejemplo 2.

Preparación de la fusión LC/A-nociceptina-H_N/A

25 [0184] Para crear la construcción LC-enlazante-nociceptina-separador-H_N (SEQ ID13), el vector pCR 4 que codifica el enlazante (SEQ ID7) se escinde con las enzimas de restricción *Bam*HI + *Sal*I. Este vector escindido sirve a continuación como el vector receptor para la inserción y ligadura del ADN de LC/A (SEQ ID1) escindido también mediante *Bam*HI + *Sal*I. El ADN plásmido resultante se escindió a continuación con las enzimas de restricción *Bam*HI + *Hind*III y el fragmento LC/A-enlazante se insertó en un vector escindido de forma similar que contenía un único sitio de multiclonación para *Bam*HI, *Sal*I, *Pst*I, e *Hind*III como el vector pMAL (NEB). El ADN de H_N/A (SEQ ID2) se escindió a continuación con las enzimas de restricción *Pst*I + *Hind*III y se insertó en la construcción pMAL-LC/A-enlazante escindida de manera similar. La construcción final contiene el ORF LC-enlazante-nociceptina-separador-H_N (SEQ ID13) para expresión como proteína de la secuencia ilustrada en la SEQ ID14.

35 **Ejemplo 14 - Preparación de una molécula comparativa de proteína de fusión LC/A-nociceptina-H_N/A (nociceptina se encuentra en el extremo N de la cadena LC)**

40 [0185] Para crear la construcción nociceptina-separador-LC/A-H_N/A, se sintetiza como se ha descrito en el Ejemplo 13 un enlazante de serotipo A con la adición de un sitio de Factor Xa para la activación, dispuesto como *Bam*HI-*Sal*I-enlazante-sitio de la proteasa-enlazante-*Pst*I-*Xba*I-codón de detención-*Hind*III (SEQ ID8). El vector pCR 4 que codifica el enlazante se escinde con las enzimas de restricción *Bam*HI + *Sal*I. Este vector escindido sirve a continuación como el vector receptor para la inserción y ligadura del ADN de LC/A (SEQ ID1) escindido también mediante *Bam*HI + *Sal*I. El ADN plásmido resultante se escindió a continuación con las enzimas de restricción *Bam*HI + *Hind*III y el fragmento LC/A-enlazante se insertó en un vector escindido de forma similar que contenía la inserción de nociceptina con presentación en el extremo N (SEQ ID9). Esta construcción se escindió a continuación con *Ava*I + *Hind*III y se insertó en un vector de expresión tal como el plásmido pMAL (NEB). El ADN de H_N/A (SEQ ID2) DNA se escinde a continuación con las enzimas de restricción *Pst*I + *Hind*III y se insertó en la construcción pMAL-nociceptina-LC/A-enlazante escindida de manera similar. La construcción final contiene el ORF nociceptina-enlazante-LC/A-H_N (SEQ ID51) para expresión como proteína de la secuencia ilustrada en la SEQ ID52.

50 **Ejemplo 15 - Preparación y purificación de una familia de la proteína de fusión LC/A-nociceptina-H_N/A expresada/purificada con separadores de longitud variable**

55 [0186] Utilizando la misma estrategia empleada en el Ejemplo 2, se preparó una gama de enlazantes de ADN que codificaban la nociceptina y un contenido separador variable. Usando una de las diferentes herramientas informáticas de traducción inversa [por ejemplo EditSeq que es la mejor para traducción inversa de *E. coli* (DNASTAR Inc.), o la herramienta Backtranslation v2.0 (Entelechon)], se determina la secuencia de ADN que codifica la región enlazante-ligando-separador. A continuación, se incorporan sitios de restricción a la secuencia de ADN y se puede disponer como *Bam*HI-*Sal*I-enlazante-sitio de la proteasa-nociceptina-*Nhe*I-separador-*Spe*I-*Pst*I-*Xba*I-codón de detención-*Hind*III (SEQ ID53 a SEQ ID57). Es importante asegurar que se mantiene el marco de lectura correcto para el separador, la nociceptina y las secuencias de restricción y que la secuencia *Xba*I no va precedida por las bases, TC lo que daría por resultado la metilación en DAM. La secuencia de ADN se criba en busca de la incorporación de la secuencia de restricción y el resto de secuencias adicionales se eliminan

manualmente de la secuencia asegurando el mantenimiento del uso del codón de *E. coli*. El uso del codón de *E. coli* se evalúa mediante referencia a programas informáticos tales como Graphical Codon Usage Analyser (Geneart), y la relación entre el contenido en % de GC y el uso del codón se evalúa por referencia a las tablas publicadas de uso de codón (por ejemplo, la edición GenBank 143, 13 de septiembre de 2004). Esta secuencia de ADN optimizada se sintetiza comercialmente con posterioridad (por ejemplo por Entelechon, Geneart o Sigma-Genosys) y se proporciona al vector pCR 4.

[0187] Entre los separadores creados se incluyen:

Tabla 1

Código	Secuencia de proteína del enlazante	SEQ ID del ADN enlazante
GS10	ALAGGGGSALVLQ	53
GS15	ALAGGGGSGGGGSALVLQ	54
GS25	ALAGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSALVLQ	55
GS30	ALAGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSALVLQ	56
HX27	ALAAEAAAKEAAAKEAAAKAGGGGSALVLQ	57

10 [0188] A modo de ejemplo, para crear la construcción de fusión LC/A-CPN(GS15)-H_NA (SEQ ID58), el vector pCR 4 que codifica el enlazante (SEQ ID54) se escinde con las enzimas de restricción *Bam*HI + *Sal*I. Este vector escindido sirve a continuación como el vector receptor para la inserción y ligadura del ADN de LC/A (SEQ ID1) escindido también mediante *Bam*HI + *Sal*I. El ADN plásmido resultante se escindió a continuación con las enzimas de restricción *Bam*HI + *Hind*III y el fragmento LC/A-enlazante se insertó en un vector escindido de forma similar que contenía un único sitio de multiclonación para *Bam*HI, *Sal*I, *Pst*I, e *Hind*III como el vector pMAL (NEB). El ADN de H_NA (SEQ ID2) DNA se escinde a continuación con las enzimas de restricción *Pst*I + *Hind*III y se insertó en la construcción pMAL- LC/A-enlazante escindida de manera similar. La construcción final contiene el ORF LC/A-CPN(GS15)-H_N (SEQ ID58) para expresión como proteína de la secuencia ilustrada en la SEQ ID59.

20 [0189] Como ejemplo adicional, para crear la construcción de fusión LC/A-CPN(GS25)-H_NA (SEQ ID60), el vector pCR 4 que codifica el enlazante (SEQ ID55) se escinde con las enzimas de restricción *Bam*HI + *Sal*I. Este vector escindido sirve a continuación como el vector receptor para la inserción y ligadura del ADN de LC/A (SEQ ID1) escindido con *Bam*HI + *Sal*I. El ADN plásmido resultante se escindió a continuación con las enzimas de restricción *Bam*HI + *Hind*III y el fragmento LC/A-enlazante se insertó en un vector escindido de forma similar que contenía un único sitio de multiclonación para *Bam*HI, *Sal*I, *Pst*I, e *Hind*III como el vector pMAL (NEB). El ADN de H_NA (SEQ ID2) DNA se escinde a continuación con las enzimas de restricción *Pst*I + *Hind*III y se insertó en la construcción pMAL- LC/A-enlazante escindida de manera similar. La construcción final contiene el ORF LC/A-CPN(GS25)-H_N (SEQ ID60) para expresión como proteína de la secuencia ilustrada en la SEQ ID61.

30 [0190] Los variantes de la fusión LC/A-CPN-H_NA consistentes en GS10, GS30 y HX27 se crearon de forma similar. Mediante la metodología de purificación descrita en el Ejemplo 9, la proteína de fusión se purificó a partir de pasta de células de *E. coli*. La Figura 9 ilustra el producto purificado obtenido en el caso de LC/A-CPN(GS10)-H_NA, LC/A-CPN (GS15)-H_NA, LC/A-CPN(GS25)-H_NA, LC/A-CPN(GS30)-H_NA y LC/A-CPN(HX27)-H_NA.

35 Ejemplo 16 – Evaluación de la eficacia *in vitro* de una fusión LC/A-nociceptina-H_NA

[0191] La proteína de fusión se preparó según los Ejemplos 2 y 9 y se evaluó en el modelo de células neuronales eDRG.

40 [0192] Los ensayos de inhibición de liberación de la sustancia P y su escisión mediante SNAP-25 se han descrito anteriormente (Duggan y col., 2002, J. Biol. Chem., 277, 34846-34852), Brevemente, neuronas de ganglio de la raíz dorsal se cosecharon procedentes de fetos de rata Sprague-Dawley con 15 días de vida y las células disociadas se plaquearon en placas de 24 pocillos revestidas con Matrigel a una densidad de 1 x 10⁶ células/pocillo. Un día tras el plaqueo, las células se trataron con citosina β-D-arabinofuranósido 10 μM durante 48 h. Las células se mantuvieron en medio mínimo esencial de Dulbecco suplementado con suero de ternera fetal terminoinactivado al 5%, L-glutamina 5 mM, D-glucosa al 0,6% suplemento B27 al 2%, y 100 ng/ml de factor de crecimiento de nervio de ratón 2.5S. Los cultivos se mantuvieron durante 2 semanas a 37°C en 95% aire/CO₂ al 95% antes de añadir los materiales de ensayo.

[0193] La liberación de sustancia P desde eDRG se evaluó mediante ensayo inmunosorbente ligado a enzima. Brevemente, las células eDRG se lavaron dos veces con solución salina equilibrada con bajo contenido en potasio (BSS: KCl 5 mM, NaCl 137 mM, MgCl₂ 1,2 mM, glucosa 5 mM, KH₂PO₄ 0,44 mM, HEPES 20 mM), pH 7,4, CaCl₂ 2 mM). Las muestras iniciales se obtuvieron incubando cada pocillo durante 5 min con 1 ml de BSS bajo en potasio. Tras eliminación de este tampón, las células se estimularon a liberar por incubación con 1 ml de tampón con alto contenido en potasio (BSS como anteriormente modificado para incluir KCl 100 mM isotómicamente equilibrado con NaCl) durante 5 min. Todas las muestras se retiraron a tubos sobre hielo antes del ensayo de la sustancia P. Los lisados celulares se prepararon por adición de 250 μ l de ácido acético 2 M/ácido trifluoroacético al 0,1 % para lisar las células, evaporación centrífuga, y resuspensión en 500 μ l de tampón de ensayo. Las muestras diluidas se evaluaron para el contenido en sustancia P. Se midió la inmunoreactividad de la sustancia P usando los kits Substance P Enzyme Immunoassay (Cayman Chemical Company o R&D Systems) según las instrucciones de los fabricantes. La sustancia P se expresa en pg/ml relativos a una curva patrón de sustancia P analizada en paralelo.

[0194] Se llevaron a cabo análisis SDS-PAGE y de transferencia Western usando protocolos estandarizados (Novex). Las proteínas SNAP-25 se resolvieron en un gel de poliacrilamida con Tris al 12%/glicina (Novex) y posteriormente se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Las membranas se sondearon con un anticuerpo monoclonal (SMI-81) que reconoce SNAP-25 escindida e intacta. La unión específica se visualizó mediante anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa y un sistema de detección quimioluminiscente. La escisión de SNAP-25 se cuantificó mediante barrido densitométrico (Molecular Dynamics Personal SI, programa informático de análisis de datos ImageQuant). El porcentaje de escisión de SNAP-25 se calculó mediante la siguiente fórmula: (SNAP-25 escindida/ (SNAP-25 escindida+intacta)) x100.

[0195] Tras exponer las neuronas eDRG a una fusión LC/A-nociceptina-H_N/A (denominada CPN-A), se observó tanto inhibición de la liberación de sustancia P como la escisión de SNAP-25 (Figura 10). Tras 24 h de exposición a la fusión, se consiguió un 50% de la escisión máxima de SNAP-25 mediante una concentración de fusión de 6,3 \pm 2,5 nM.

[0196] El efecto de la fusión también se evaluó en momentos temporales definidos tras 16 h de exposición de eDRG a CPN-A. La Figura 11 ilustra la prolongada duración de la acción de la proteína de fusión CPN-A, cuya actividad mensurable siguió siendo observada 28 días después de la exposición.

Ejemplo 17 – Evaluación de la eficacia *in vitro* de una fusión LC/A-nociceptina variante-H_N/A

[0197] La proteína de fusión preparada según los Ejemplos 8 y 9 se evaluó en el modelo de células neuronales eDRG utilizando el procedimiento descrito en el Ejemplo 16.

[0198] Tras exponer las neuronas eDRG a una fusión LC/A-nociceptina variante-H_N/A (denominada CPNv-A), se observó tanto inhibición de la liberación de sustancia P como la escisión de SNAP-25. Tras 24 h de exposición a la fusión, se consiguió un 50% de la escisión máxima del SNAP-25 mediante una concentración de fusión de 1,4 \pm 0,4 nM (Figura 12).

[0199] El efecto de la fusión también se evaluó en momentos temporales definidos tras 16 h de exposición de eDRG a CPN-A. La Figura 13 ilustra la prolongada duración de la acción de la proteína de fusión CPN-A, cuya actividad mensurable siguió siendo observada 24 días después de la exposición.

[0200] La capacidad de enlace de la proteína de fusión CPNv-A también se evaluó en comparación a la fusión CPN-A. La Figura 14 ilustra los resultados de un experimento de competición para determinar la capacidad de enlace al receptor ORL-1. Se demostró que CPNv-A desplazaba la [³H]-nociceptina, confirmando de esta forma que el acceso al receptor es posible con el ligando en el formato de presentación central.

Ejemplo 18 - Preparación de una proteína de fusión LC/A-nociceptina variante-H_N/A que se activa por tratamiento con enteroquinasa

[0201] Siguiendo los procedimientos utilizados en los Ejemplos 1 y 2, se crearon LC/A (SEQ ID1) y H_N/A (SEQ ID2) y se insertaron en el enlazante de nociceptina variante serotipo A dispuestos como *Bam*HI-*Sal*I-enlazante-sitio de la proteasa enteroquinasa-nociceptina variante-*Nhe*I-separador-*Spe*I-*Pst*I-*Xba*I-codón de detención-*Hind*III (SEQ ID62). La construcción final contiene las secuencias ORF LC-enlazante-nociceptina variante -separador-H_N (SEQ ID63) para expresión como proteína de la secuencia ilustrada en la SEQ ID64. La proteína de fusión se denomina CPNv(Ek)-A. La Figura 15 ilustra la purificación de CPNv(Ek)-A a partir de *E. coli* siguiendo los procedimientos utilizados en el Ejemplo 9 pero utilizando enteroquinasa para la activación a 0,00064 μ g por 100 μ g de proteína de fusión.

Ejemplo 19 – Evaluación de la eficacia *in vitro* de una proteína de fusión LC/A-nociceptina variante-H_N/A que se había activado por tratamiento con enteroquinasa

[0202] La CPNv(Ek)-A preparada en el Ejemplo 18 se obtuvo en forma purificada y se aplicó al modelo celular eDRG para evaluar la escisión de SNAP-25 (usando la metodología del Ejemplo 16). La Figura 16 ilustra la escisión de SNAP-25 tras 24 h de exposición de eDRG a CPNv(Ek)-A. Se observó que la eficacia de la escisión era similar a la conseguida con el material escindido mediante Factor Xa, como se registra en el Ejemplo 17.

Ejemplo 20 – Preparación de una proteína de fusión LC/C-nociceptina variante-H_N/C con un enlazante de activación Factor Xa derivado del serotipo A

[0203] Siguiendo los procedimientos utilizados en el Ejemplo 4, se crearon LC/C (SEQ ID5) y H_N/C (SEQ ID6) y se insertaron en el enlazante de nociceptina variante de serotipo A dispuesto como *Bam*HI-*Sa*II-enlazante-proteasa-nociceptina variante-*Nhe*I-separador-*Spe*I-*Pst*I-*Xba*I-codón de detención-*Hind*III (SEQ ID65). La construcción final contiene las secuencias ORF LC-enlazante-nociceptina variante -separador-H_N (SEQ ID66) para expresión como proteína de la secuencia ilustrada en la SEQ ID67. La proteína de fusión se denomina CPNv-C (act. A). La Figura 17 ilustra la purificación de CPNv-C (act. A) a partir de *E. coli* siguiendo los procedimientos usados en el Ejemplo 9.

Ejemplo 21 – Evaluación de la eficacia *in vitro* de una proteína de fusión LC/C-nociceptina variante-H_N/C

[0204] Siguiendo los procedimientos utilizados en el Ejemplo 4, la CPNv-C (act. A) preparada en el Ejemplo 20 se obtuvo en forma purificada y se aplicó al modelo celular eDRG para evaluar la escisión de SNAP-25 (usando la metodología del Ejemplo 16). Tras 24 h de exposición a la fusión, se consiguió un 50% de la escisión máxima de la sintaxina mediante una concentración de fusión de $3,1 \pm 2,0$ nM. La Figura 18 ilustra la escisión de sintaxina tras 24 h de exposición de eDRG a CPNv-C (act. A).

Ejemplo 22 – Evaluación de la eficacia *in vivo* de una fusión LC/A-nociceptina-H_N/A

[0205] Se evaluó la capacidad de una fusión LC/A-nociceptina-H_N/A (CPN/A) para inhibir la alodinia aguda mecánicamente inducida por capsaicina tras una inyección subcutánea intraplantar en la almohadilla de la pata trasera. Los animales de ensayo se evaluaron por la frecuencia de retirada de la pata (PWF%) en respuesta a una serie de estímulos con un filamento Von Frey de 10 g (10 estímulos x 3 pruebas) antes de su alistamiento en el estudio, tras el tratamiento subcutáneo con CPN/A pero antes de la capsaicina, y tras el estímulo con capsaicina tras la inyección de CPN/A (promedio de respuestas a 15' y 30'). El estímulo con capsaicina se consiguió por inyección de 10 µl de una disolución al 0,3%. Se prepararon diluciones en serie en BSA al 0,5%/solución salina. La Figura 19 ilustra la inversión de la alodinia mecánica que se consigue mediante pretratamiento de los animales con un intervalo de concentraciones de la fusión LC/A-nociceptina-H_N/A.

[0206] Se evaluó la capacidad de una fusión LC/A-nociceptina-H_N/A (CPN/A) para inhibir la alodinia mecánicamente inducida por estreptozotocina (STZ) en ratas. La alodinia mecánicamente inducida por STZ en ratas se consigue por inyección de estreptozotocina (i.p. o i.v.) lo que da por resultado la destrucción de las células β pancreáticas llevando a la pérdida de la producción de insulina, con estrés metabólico simultáneo (hiperglucemia e hiperlipidemia). De este modo, STZ induce diabetes Tipo I. Adicionalmente, el tratamiento con STZ lleva a un desarrollo progresivo de neuropatía, que sirve como modelo de dolor crónico con hiperalgesia y alodinia que puede reflejar signos observados en seres humanos diabéticos (neuropatía periférica diabética).

[0207] Se trataron ratas macho Sprague-Dawley (250-300 g) con 65 mg/kg de STZ en tampón citrato (I.V.) y se midieron semanalmente glucosa y lípidos en sangre para definir la adecuación del modelo. El umbral de retirada de la pata (PWT) se mide en respuesta a una serie de estímulos con un filamento Von Frey durante un periodo de tiempo. Se considera la alodinia establecida cuando el PWT en dos fechas de ensayo consecutivas (separadas por una semana) mide menos de 6 g en la escala. En este punto, las ratas se aleatorizaron bien a un grupo con solución salina (control de eficacia negativa), grupo de la gabapentina (control de eficacia positiva) o a un grupo de ensayo (CPN/A). Los materiales de ensayo (20-25 µl) se inyectaron subcutáneamente en una sola inyección (excepto la gabapentina) y el PWT se midió 1 día después del tratamiento y periódicamente con posterioridad durante un periodo de 2 semanas. La gabapentina (30 mg/kg i.p. @ 3 ml/kg de volumen de inyección) se inyectó diariamente, 2 horas antes de la prueba de PWT. La Figura 20 ilustra la inversión de la alodinia mecánica que se consigue mediante pretratamiento de los animales con 750 ng de CPN/A. Los datos se obtuvieron durante un periodo de 2 semanas tras una única inyección de CPN/A.

Ejemplo 23 – Evaluación de la eficacia *in vivo* de una fusión LC/A-nociceptina variante-H_N/A

[0208] Se evaluó la capacidad de una fusión LC/A-nociceptina variante-H_N/A (CPNv/A) para inhibir la alodinia mecánicamente inducida por capsaicina tras una inyección subcutánea intraplantar en la almohadilla de la pata trasera. Los animales de ensayo se evaluaron por la frecuencia de retirada de la pata (PWF en %) en respuesta a una serie de estímulos con un filamento Von Frey de 10 g (10 estímulos x 3 pruebas) antes de su alistamiento en el

estudio (Pre-Treat);, tras el tratamiento intraplantar subcutáneo con CPNv/A pero antes de la capsaicina (Pre-CAP); y tras el estímulo con capsaicina tras la inyección de CPNv/A (promedio de respuestas a 15' y 30'; CAP). El estímulo con capsaicina se consiguió por inyección de 10 µl de una disolución al 0,3%. Se prepararon diluciones en serie en BSA al 0,5%/solución salina.

[0209] La figura 21 ilustra la inversión de la alodinia mecánica que se consigue mediante pretratamiento de los animales con un intervalo de concentraciones de la fusión LC/A-nociceptina variante-H_N/A en comparación con la inversión que se consigue con la adición de la fusión LC/A- nociceptina-H_N/A. Estos datos se expresan como el diferencial normalizado de la frecuencia de retirada de la pata, en el que la diferencia entre los valores de la respuesta punta (post-capsaicina) y el de la respuesta inicial (pre-capsaicina) se expresan en forma de porcentaje. Con este análisis, puede verse que CPNv/A es más potente que CPN/A ya que se necesita una dosis inferior de CPNv/A para conseguir un efecto analgésico similar al visto con CPN/A.

Ejemplo 24 - Preparación de una proteína de fusión LC/A-leu encefalina-H_N/A

[0210] Debido al pequeño tamaño, de cinco aminoácidos, del ligando met-encefalina, se creó la fusión LC/A-leu encefalina-H_N/A mediante mutagénesis sitiodirigida [por ejemplo mediante Quickchange (Stratagene Inc.)] usando la fusión LC/A-nociceptina-H_N/A (SEQ ID13) como plantilla. Se diseñaron oligonucleótidos que codificaban el péptido YGGFL de la leu-encefalina, asegurando el mantenimiento del uso convencional del codón de *E. coli* y la no incorporación de sitios de restricción adicionales, flanqueado por secuencias complementarias de la región enlazante de la fusión LC/A-nociceptina-H_N/A (SEQ ID13) en cualquiera de los lados de la sección de la nociceptina. El producto SDM se comprueba por secuenciación, y la construcción final que contiene el LC-enlazante-leu encefalina-separador-H_N ORF (SEQ ID68) para expresión como proteína de la secuencia se ilustra en la SEQ ID69. La proteína de fusión se denomina CPLE-A. La Figura 22 ilustra la purificación de CPLE-A a partir de *E. coli* siguiendo los procedimientos usados en el Ejemplo 9.

Ejemplo 25 – Expresión y purificación de una proteína de fusión LC/A-beta-endorfina-H_N/A

[0211] Siguiendo los procedimientos utilizados en el Ejemplo 9, y con la proteína de fusión LC/A-beta-endorfina-H_N/A (denominada CPBE-A) creada en el Ejemplo 7, se purificó la CPBE-A a partir de *E. coli*. La Figura 23 ilustra la proteína purificada según análisis mediante SDS-PAGE.

Ejemplo 26 - Preparación de una proteína de fusión LC/A-nociceptina mutante-H_N/A

[0212] Debido a la modificación en un solo aminoácido necesario para mutar la secuencia de la nociceptina en la posición 1 de Phe a Tyr, se creó la fusión LC/A-nociceptina mutante-H_N/A mediante mutagénesis sitiodirigida [por ejemplo mediante Quickchange (Stratagene Inc.)] usando la fusión LC/A-nociceptina-H_N/A (SEQ ID13) como plantilla. Se diseñaron oligonucleótidos que codificaban tirosina en la posición 1 de la secuencia de la nociceptina, asegurando el mantenimiento del uso convencional del codón de *E. coli* y la no incorporación de sitios de restricción adicionales, flanqueado por secuencias complementarias de la región enlazante de la fusión LC/A-nociceptina-H_N/A (SEQ ID13) en cualquiera de los lados de la sección de la nociceptina. El producto SDM se comprueba por secuenciación, y la construcción final que contiene el ORF LC/A-nociceptina mutante-separador-H_N/A (SEQ ID70) para expresión como proteína de la secuencia se ilustra en la SEQ ID71. La proteína de fusión se denomina CPOP-A. La Figura 24 ilustra la purificación de CPOP-A a partir de *E. coli* siguiendo los procedimientos usados en el Ejemplo 9.

Ejemplo 27 – Preparación y evaluación de una proteína de fusión LC/A-nociceptina variante-H_N/A

[0213] Debido a la modificación en un solo aminoácido necesario para mutar la secuencia de la nociceptina en la posición 1 de Phe a Tyr, se creó la fusión LC/A-nociceptina variante-H_N/A mediante mutagénesis sitiodirigida [por ejemplo mediante Quickchange (Stratagene Inc.)] usando la fusión LC/A-nociceptina-H_N/A (SEQ ID13) como plantilla. Se diseñaron oligonucleótidos que codificaban tirosina en la posición 1 de la secuencia de la nociceptina, asegurando el mantenimiento del uso convencional del codón de *E. coli* y la no incorporación de sitios de restricción adicionales, flanqueado por secuencias complementarias de la región enlazante de la fusión LC/A-nociceptina variante-H_N/A (SEQ ID25) en cualquiera de los lados de la sección de la nociceptina. El producto SDM se comprueba por secuenciación, y la construcción final que contiene el ORF LC/A-nociceptina mutante-separador-H_N/A (SEQ ID72) para expresión como proteína de la secuencia se ilustra en la SEQ ID73. La proteína de fusión se denomina CPOPv-A. La Figura 25 ilustra la purificación de CPOPv-A a partir de *E. coli* siguiendo los procedimientos usados en el Ejemplo 9.

[0214] Mediante la metodología descrita en el Ejemplo 16, se evaluó CPOPv-A respecto de su capacidad para escindir SNAP-25 en el modelo de células eDRG. La Figura 26 ilustra que CPOPv-A es capaz de escindir SNAP-25 en el modelo eDRG, consiguiendo un 50% de la escisión máxima de SNAP-25 tras exposición de las células a aproximadamente 5,9 nM de fusión durante 24 h.

Ejemplo 28 - Preparación de una proteína de fusión proteasa IgA-nociceptina variante-H_N/A

5 [0215] La secuencia de aminoácidos de la proteasa IgA se obtuvo de fuentes de bases de datos de acceso libre tales como GenBank (número de acceso P09790). La información respecto de la estructura de la proteasa IgA de *N. Gonorrhoeae* está disponible en la bibliografía (Pohlner y col., Gene structure and extracellular secretion of *Neisseria gonorrhoeae* IgA protease, Nature, 1987, 325(6103), 458-62). Mediante la herramienta Backtranslation v2.0 (Entelechon), se determinó la secuencia de ADN que codificaba la proteasa IgA modificada para expresión en *E. coli*. Se incorporó una secuencia de reconocimiento *Bam*HI en el extremo 5' y un codón que codificaba el aminoácido cisteína y una secuencia de reconocimiento *Sal*I se incorporaron en el extremo 3' del ADN de la IgA. La secuencia de ADN se cribó mediante MapDraw, DNASTAR Inc.) en busca de las secuencias de restricción de escisión enzimática incorporadas durante la traducción inversa. Cualquier secuencia encontrada común con respecto a las requeridas por el sistema de clonación se eliminaron manualmente de la secuencia de clonación propuesta asegurando que se mantiene el uso común del codón de *E. coli*. El uso del codón de *E. coli* se evalúa mediante Graphical Codon Usage Analyser (Geneart), y la relación entre el contenido en % de GC y el uso del codón se evalúa por referencia a las tablas publicadas de uso de codón. Esta secuencia de ADN optimizada (SEQ ID74) que contiene el marco de lectura abierto (ORF) de la IgA se sintetiza comercialmente con posterioridad.

20 [0216] La IgA (SEQ ID74) se inserta en el ORF LC-enlazante-nociceptina variante-separador-H_N (SEQ ID25) usando las enzimas de restricción *Bam*HI y *Sal*I para sustituir el LC por el ADN de la proteasa IgA. La construcción final contiene el ORF IgA-enlazante-nociceptina variante-separador-H_N (SEQ ID75) para expresión como proteína de la secuencia ilustrada en la SEQ ID76.

Ejemplo 29 - Preparación y evaluación de una proteína de fusión de endopeptidasa dirigida a nociceptina con una etiqueta de purificación de histidina que se puede eliminar.

25 [0217] Se preparó un ADN que codificaba una etiqueta his eliminable mediante Factor Xa (his6), aunque resulta evidente que son también posibles sitios de proteasas alternativas como enteroquinasa y etiquetas de purificación tal como etiquetas de histidina más largas. Usando una de las diferentes herramientas informáticas de traducción inversa [por ejemplo EditSeq que es la mejor para traducción inversa de *E. coli* (DNASTAR Inc.), o la herramienta Backtranslation v2.0 (Entelechon)], se determinó la secuencia de ADN que codificaba la región his-tag eliminable mediante Factor Xa. A continuación, se incorporan sitios de restricción a la secuencia de ADN y se puede disponer como *Nhe*I-enlazante-*Spe*I-*Pst*I-H_N/A-*Xba*I-LEIEGRSGHHHHHHcodón de detención-*Hind*III (SEQ ID77). La secuencia de ADN se cribó en busca de la secuencia de restricción incorporada y el resto de secuencias adicionales se eliminan manualmente de la secuencia asegurando el mantenimiento del uso del codón de *E. coli*. El uso del codón de *E. coli* se evalúa mediante referencia a programas informáticos tales como Graphical Codon Usage Analyser (Geneart), y la relación entre el contenido en % de GC y el uso del codón pro referencia a las tablas publicadas de uso de codón (por ejemplo, la edición GenBank 143, 13 de septiembre de 2004). Esta secuencia de ADN optimizada se sintetiza comercialmente con posterioridad (por ejemplo por Entelechon, Geneart o Sigma-Genosys) y se proporciona al vector pCR 4. Para crear la CPNv-A-FXa-HT (SEQ ID78, construcción con his-tag eliminable), el vector pCR 4 que codifica la etiqueta his eliminable se escindió con *Nhe*I y *Hind*III. A continuación, el fragmento *Nhe*I-*Hind*III se insertó en el vector LC/A-CPNv-H_N/A vector (SEQ ID25) que también se había escindido con *Nhe*I y *Hind*III. La construcción final contiene las secuencias ORF LC-enlazante-nociceptina variante-separador-FXa-etiqueta his-*Hind*III (SEQ ID78) para expresión como proteína de la secuencia ilustrada en la SEQ ID79. La Figura 27 ilustra la purificación de CPNv-A-FXa-HT a partir de *E. coli* siguiendo los procedimientos usados en el Ejemplo 9.

Ejemplo 30 - Preparación de una proteína de fusión de endopeptidasa dirigida a leu-encefalina que contiene un dominio de translocación derivado de la toxina diftérica

50 [0218] La secuencia de ADN se diseñó mediante traducción inversa de la secuencia de aminoácidos del dominio de translocación de la toxina diftérica (obtenida a partir de fuentes de datos de acceso libre tales como GenBank (número de acceso 1XDTT) usando una de las diferentes herramientas informáticas de traducción inversa [por ejemplo EditSeq que es la mejor para traducción inversa de *E. coli* (DNASTAR Inc.), o la herramienta Backtranslation v2.0 (Entelechon)]. A continuación, se incorporan sitios de restricción a la secuencia de ADN y se puede disponer como *Nhe*I-Enlazante-*Spe*I-*Pst*I-dominio de translocación de la difteria-*Xba*I-codón de detención-*Hind*III (SEQ ID80). Las secuencias de reconocimiento *Pst*I/*Xba*I se incorporan a los extremos 5' y 3' respectivamente del dominio de translocación de la secuencia, manteniendo el marco de lectura correcto. La secuencia de ADN se criba (usando un programa informático como MapDraw, DNASTAR Inc.) en busca de las secuencias de restricción de escisión enzimática incorporadas durante la traducción inversa. Cualquier secuencia encontrada común con respecto a las requeridas por el sistema de clonación se eliminaron manualmente de la secuencia de clonación propuesta asegurando que se mantiene el uso común del codón de *E. coli*. El uso del codón de *E. coli* se evalúa mediante referencia a programas informáticos tales como Graphical Codon Usage Analyser (Geneart), y la relación entre el contenido en % de GC y el uso del codón se evalúa por referencia a las tablas

publicadas de uso de codón (por ejemplo, la edición GenBank 143, 13 de septiembre de 2004). Esta secuencia de ADN optimizada que contiene el dominio de translocación de la difteria se sintetizó comercialmente a continuación como *NheI*-enlazante-*SpeI*-*PstI*-dominio de translocación de la difteria-*XbaI*-codón de detención-*HindIII* (por ejemplo de Entelechon, Geneart o Sigma-Genosys) y se proporciona al vector pCR 4 (Invitrogen). El vector pCR 4 que codifica el dominio de translocación de la difteria se escindió con *NheI* y *XbaI*. A continuación, el fragmento *NheI*-*XbaI* se insertó en el vector LC/A-CPLE-H_N/A (SEQ ID25) que también se había escindido con *NheI* y *XbaI*. La construcción final contiene las secuencias ORF LC-leu-encefalina-separador-dominio de translocación de la difteria (SEQ ID81) para expresión como proteína de la secuencia ilustrada en la SEQ ID82.

10 **Ejemplo 31 - Preparación de una proteína de fusión de endopeptidasa dirigida a una nociceptina variante que contiene un dominio LC derivado de la toxina tetánica**

15 **[0219]** La secuencia de ADN se diseñó mediante traducción inversa de la secuencia de aminoácidos de LC obtenido de la toxina tetánica [obtenida a partir de fuentes de datos de acceso libre tales como GenBank (número de acceso X04436) usando una de las diferentes herramientas informáticas de traducción inversa (por ejemplo EditSeq que es la mejor para traducción inversa de *E. coli* (DNASTAR Inc.), o la herramienta Backtranslation v2.0 (Entelechon)]. Las secuencias de reconocimiento *Bam*HI/*Sa*II se incorporan a los extremos 5' y 3' respectivamente de la secuencia, manteniendo el marco de lectura correcto (SEQ ID83). La secuencia de ADN se criba (usando un programa informático como MapDraw, DNASTAR Inc.) en busca de las secuencias de restricción de escisión enzimática incorporadas durante la traducción inversa. Cualquier secuencia encontrada común con respecto a las requeridas por el sistema de clonación se eliminaron manualmente de la secuencia de clonación propuesta asegurando que se mantiene el uso común del codón de *E. coli*. El uso del codón de *E. coli* se evalúa mediante referencia a programas informáticos tales como Graphical Codon Usage Analyser (Geneart), y la relación entre el contenido en % de GC y el uso del codón se evalúa por referencia a las tablas publicadas de uso de codón (por ejemplo, la edición GenBank 143, 13 de septiembre de 2004). Esta secuencia de ADN optimizada que contiene el marco de lectura abierto (ORF) LC de la toxina tetánica se sintetiza comercialmente con posterioridad (por ejemplo por Entelechon, Geneart o Sigma-Genosys) y se proporciona al vector pCR 4 (Invitrogen). El vector pCR 4 que codifica el LC de TeNT se escinde con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Sa*II. A continuación, el fragmento *Bam*HI-*Sa*II se insertó en el vector LC/A-CPNV-H_N/A (SEQ ID25) que también se había escindido con *Bam*HI y *Sa*II. La construcción final contiene las secuencias ORF LC de TeNT-enlazante-nociceptina variante-separador-H_N (SEQ ID84) para expresión como proteína de la secuencia ilustrada en la SEQ ID85.

35 **Ejemplo 32 – Preparación de una proteína de fusión LC/C-nociceptina variante-H_N/C con un enlazante natural de tipo C susceptible de escisión mediante Factor Xa**

40 **[0220]** Siguiendo los procedimientos utilizados en el Ejemplo 4, se crearon LC/C (SEQ ID5) y H_N/C (SEQ ID6) y se insertaron en el enlazante de nociceptina variante de serotipo C dispuesto como *Bam*HI-*Sa*II-enlazante-nociceptina variante-*NheI*-separador-*SpeI*-*PstI*-*XbaI*-codón de detención-*HindIII* (SEQ ID86). La construcción final contiene las secuencias ORF LC-enlazante-nociceptina variante-separador-H_N (SEQ ID87) para expresión como proteína de la secuencia ilustrada en la SEQ ID88. La proteína de fusión se denomina CPNV-C (act. C).

45

REIVINDICACIONES

1. Proteína de fusión de polipéptido monocatenario que comprende:
- 5 a. una proteasa no citotóxica, o un fragmento de la misma, cuya proteasa o fragmento de proteasa es capaz de escindir una proteína del aparato de fusión exocítica de un aferente sensorial nociceptor;
- b. un resto de reconocimiento que es capaz de unirse a un sitio de unión en el aferente sensorial nociceptor, cuyo sitio de unión es capaz de experimentar endocitosis para incorporarse a un endosoma en el aferente sensorial nociceptor;
- 10 c. un sitio de escisión por proteasa en cuyo sitio la proteína de fusión se puede escindir mediante una proteasa, en el que el sitio de escisión por la proteasa está ubicado entre la proteasa no citotóxica o fragmento de la misma y el resto de reconocimiento;
- d. un dominio de translocación que es capaz de translocar la proteasa o fragmento de la proteasa del interior de un endosoma, a través de la membrana endosómica y en el citosol del aferente sensorial nociceptor;
- 15 en el que el resto de reconocimiento se ubica entre el sitio de escisión por la proteasa y el dominio de translocación; y en el que el resto de reconocimiento y el sitio de escisión por proteasa están separados por como máximo 10 restos de aminoácidos,
- y en el que el resto de reconocimiento y el sitio de escisión por proteasa no están separados por cero restos de aminoácidos,
- 20 2. Proteína de fusión, según la reivindicación 1, en la que el resto de reconocimiento y el sitio de escisión por la proteasa están separados por como máximo 5 restos de aminoácidos.
3. Proteína de fusión, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que proteasa no citotóxica es una cadena L de la toxina clostrídica o una proteasa IgA.
- 25 4. Proteína de fusión, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el dominio de translocación es el dominio H_N de una neurotoxina clostrídica.
5. Proteína de fusión, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el resto de reconocimiento comprende como máximo 50 restos de aminoácidos, preferiblemente como máximo 40 restos de aminoácidos, más preferiblemente como máximo 30 restos de aminoácidos, y lo más preferiblemente, como máximo 20 restos de aminoácidos.
- 30 6. Proteína de fusión, según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en la que el resto de reconocimiento:
- 35 (i) es un opioide;
- (ii) es un agonista de un receptor presente en un aferente sensorial nociceptor, preferiblemente en el que el resto de reconocimiento es un agonista de un receptor presente en un aferente sensorial nociceptor primario;
- (iii) se une al receptor ORL₁, preferiblemente en el que el resto de reconocimiento se une específicamente al receptor ORL₁, más preferiblemente en el que el resto de reconocimiento es un agonista del receptor ORL₁.
- 40 7. Proteína de fusión, según la reivindicación 6, en la que el resto de reconocimiento tiene una homología de al menos un 70% con respecto a la SEQ ID No. 38 o un fragmento de la misma, o en la que el resto de reconocimiento tiene una homología de al menos un 80% con respecto a la SEQ ID No. 38 o un fragmento de la misma, o en la que el resto de reconocimiento tiene una homología de al menos un 90% con respecto a la SEQ ID No. 38 o un fragmento de la misma, o en la que el resto de reconocimiento tiene una homología de al menos un 95% con respecto a la SEQ ID No. 38 o un fragmento de la misma, o en la que el resto de reconocimiento es la SEQ ID No. 38 o un fragmento de la misma, o en la que el resto de reconocimiento es una de las SEQS ID NO: 40, 42, 44, 46, 48 o 50, o en la que el resto de reconocimiento es nociceptina.
- 45 8. Proteína de fusión, según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en la que el resto de reconocimiento se selecciona del grupo que consiste en nociceptina, β-endorfina, endomorfin-1, endomorfin-2, dinorfina, met-enkefalina, leu-enkefalina, galanina, y péptido PAR-2.
- 50 9. Proteína de fusión, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la proteína de fusión comprende una etiqueta de purificación;
- 55 preferiblemente, en la que la proteína de fusión comprende una etiqueta de purificación, que está presente en el extremo N y/o en el extremo C de la proteína de fusión; más preferiblemente, en la que la etiqueta de purificación está unida a la proteína de fusión mediante una molécula peptídica separadora.
- 60 10. Proteína de fusión, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el dominio de translocación está separado del resto de reconocimiento por una molécula peptídica separadora.
11. Secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína de fusión de polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones anteriores.

- 5 12. Vector de ADN, que comprende un promotor, una secuencia de ácido nucleico, según la reivindicación 11, en el que dicha secuencia de ADN se ubica en dirección 3' del promotor, y un terminador se ubica en dirección 3' de la construcción de ADN.
- 10 13. Procedimiento para preparar una proteína de fusión de polipéptido monocatenario, según cualquiera de las reivindicaciones 1-10, que comprende expresar una secuencia de ácido nucleico, según la reivindicación 11, o un vector de ADN, según la reivindicación 12, en una célula hospedadora.
- 15 14. Procedimiento para preparar un agente no citotóxico, que comprende:
a. poner en contacto una proteína de fusión de polipéptido monocatenario, según cualquiera de las reivindicaciones 1-10, con una proteasa capaz de escindir el sitio de escisión por la proteasa;
b. escindir el sitio de escisión por la proteasa; y formar de esta manera una proteína de fusión bicatenaria.
- 20 15. Un polipéptido no citotóxico, que se puede obtener según el procedimiento de la reivindicación 14, en el que el polipéptido es un polipéptido bicatenario, y en el que:
a. la primera cadena comprende la proteasa no citotóxica, o fragmento de la misma, cuya proteasa o fragmento de proteasa es capaz de escindir una proteína del aparato de fusión exocítica de un aferente sensorial nociceptor;
b. la segunda cadena comprende el TM y el dominio de translocación que es capaz de translocar la proteasa o el fragmento de proteasa del interior de un endosoma, a través de la membrana endosómica y en el citosol del aferente sensorial nociceptor; y
la primera y segunda cadenas están unidas por enlace disulfuro.
- 25 16. Uso de una proteína de fusión, según cualquiera de las reivindicaciones 1-10, o un polipéptido según la reivindicación 15, en la fabricación de un medicamento para tratar, prevenir o aminorar el dolor; preferiblemente cuando el dolor es dolor crónico.
- 30 17. Proteína de fusión, según cualquiera de las reivindicaciones 1-10, o un polipéptido según la reivindicación 15, para uso en el tratamiento, prevención o para aminorar el dolor; preferiblemente cuando el dolor es dolor crónico.

Figura 1

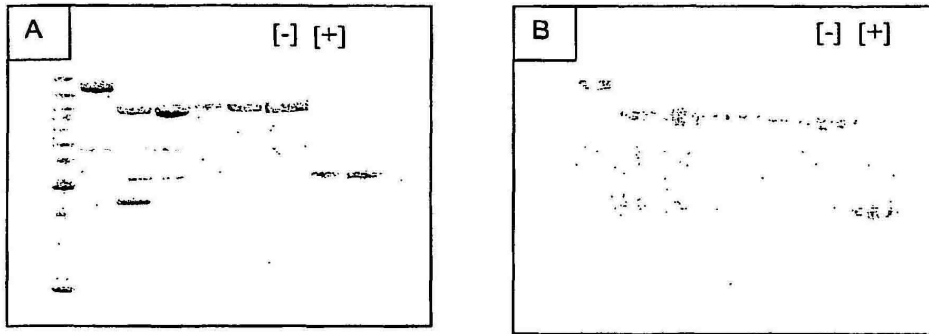


Figura 2

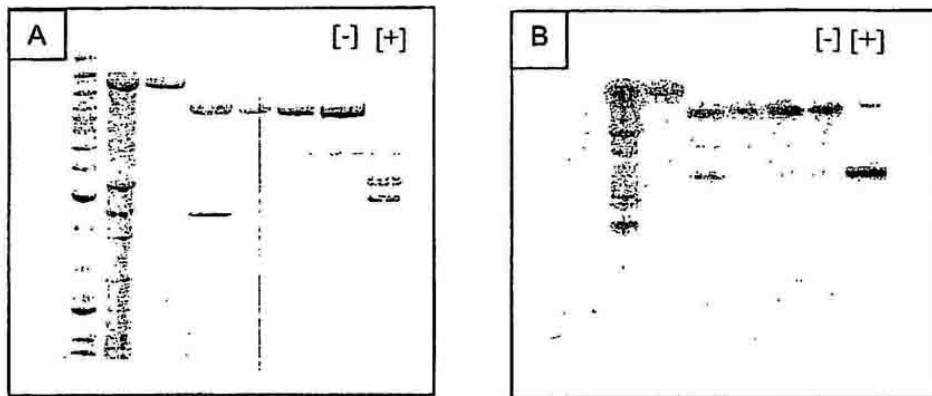


Figura 3

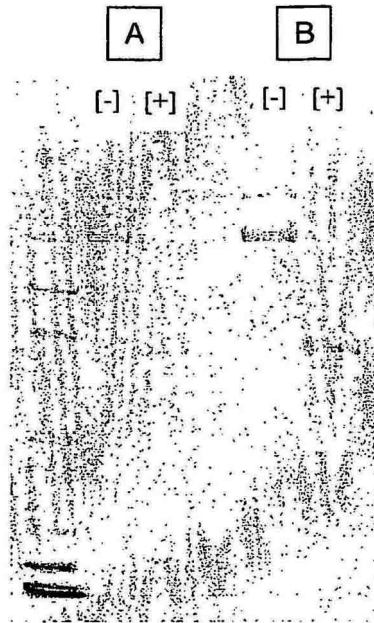


Figura 4

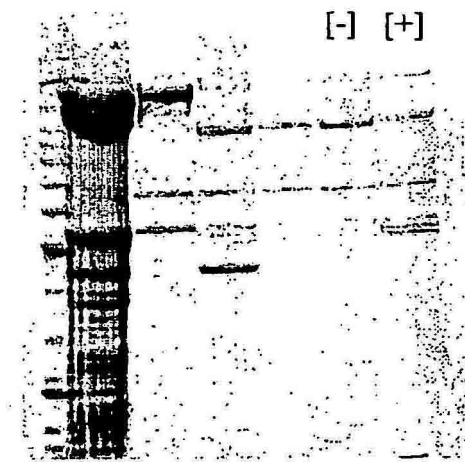


Figura 5

Ensayo de competición: fusiones nociceptina-LHN/A
frente a [³H]-nociceptina 1 nM sobre células eDRG (4° C)

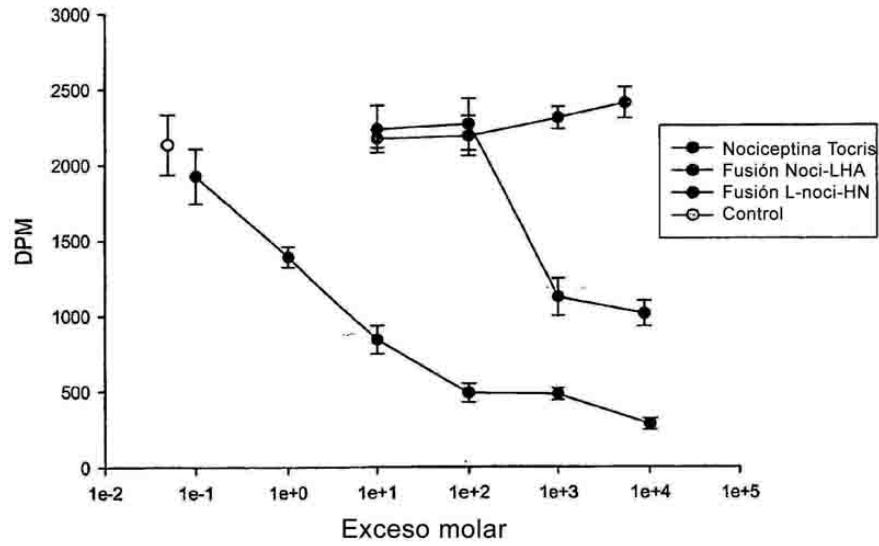


Figura 6

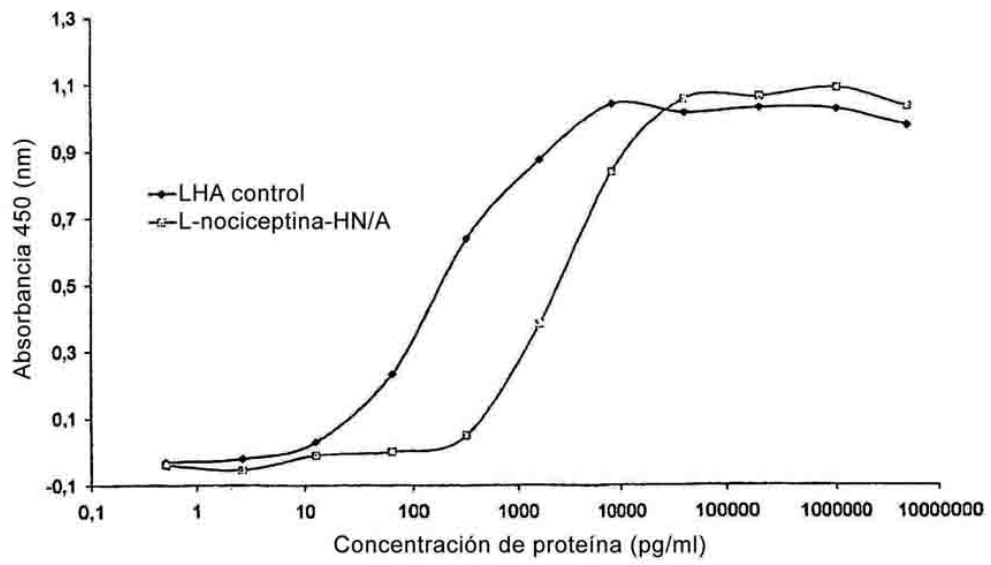


Figura 7

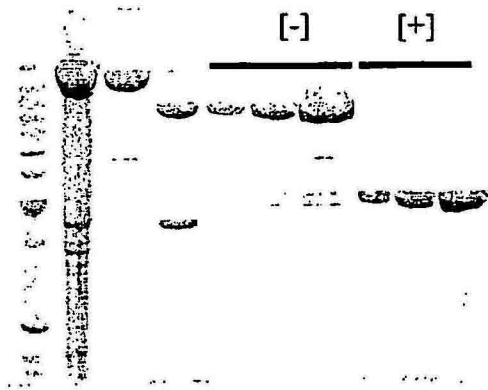


Figura 8

Ensayo de competición: fusiones CPN frente a [³H]-nociceptina
1 nM sobre células eDRG durante 1 h a 4° C

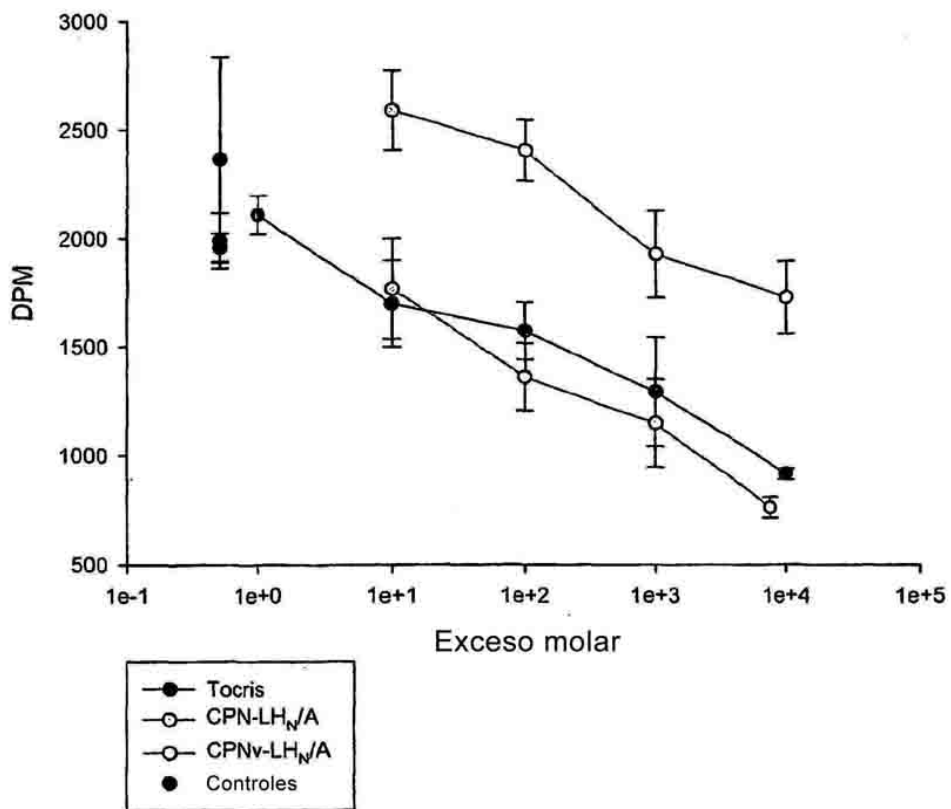


Figura 9

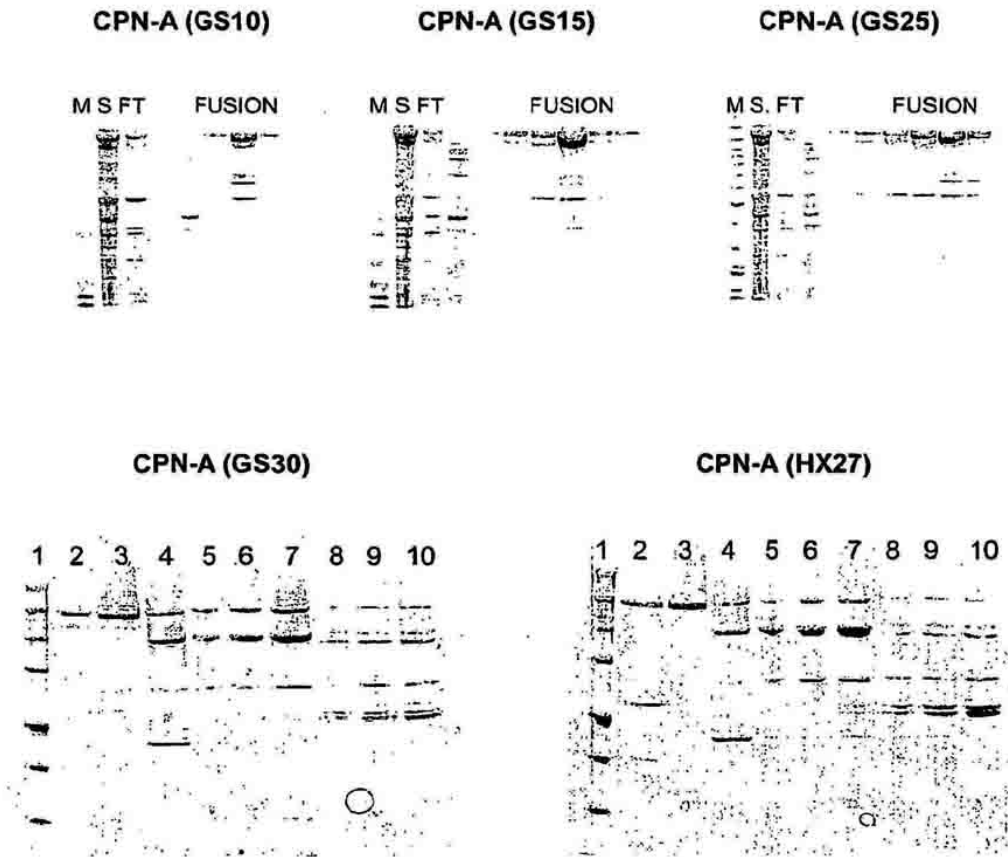


Figura 10

CPN-A en eDRG para el día 1

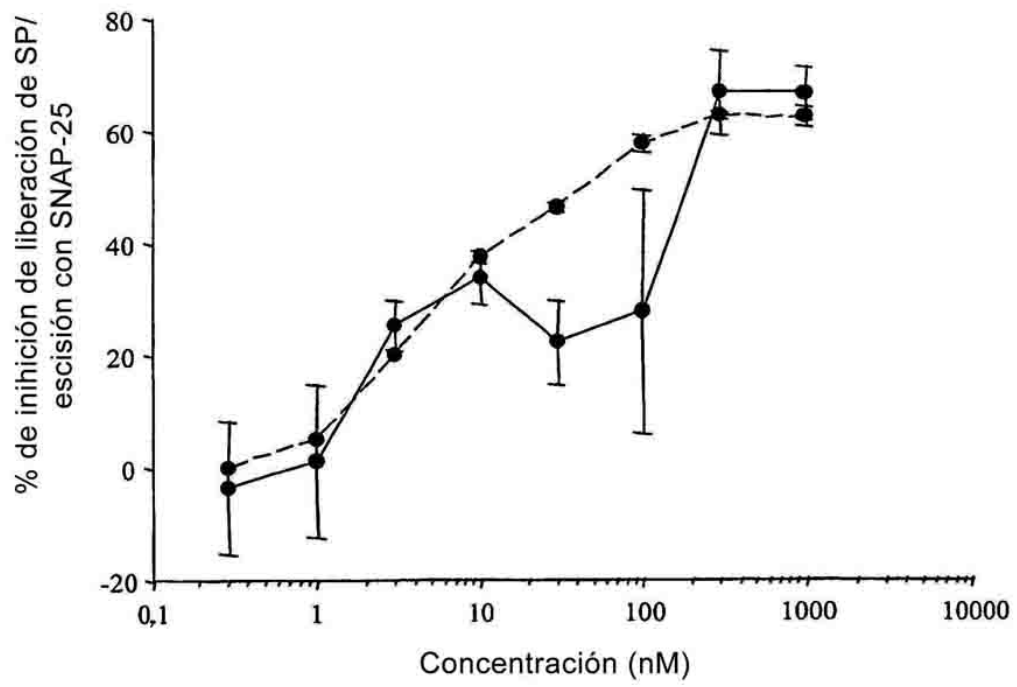


Figura 11

Duración de la acción tras exposición de eDRG durante 1 día

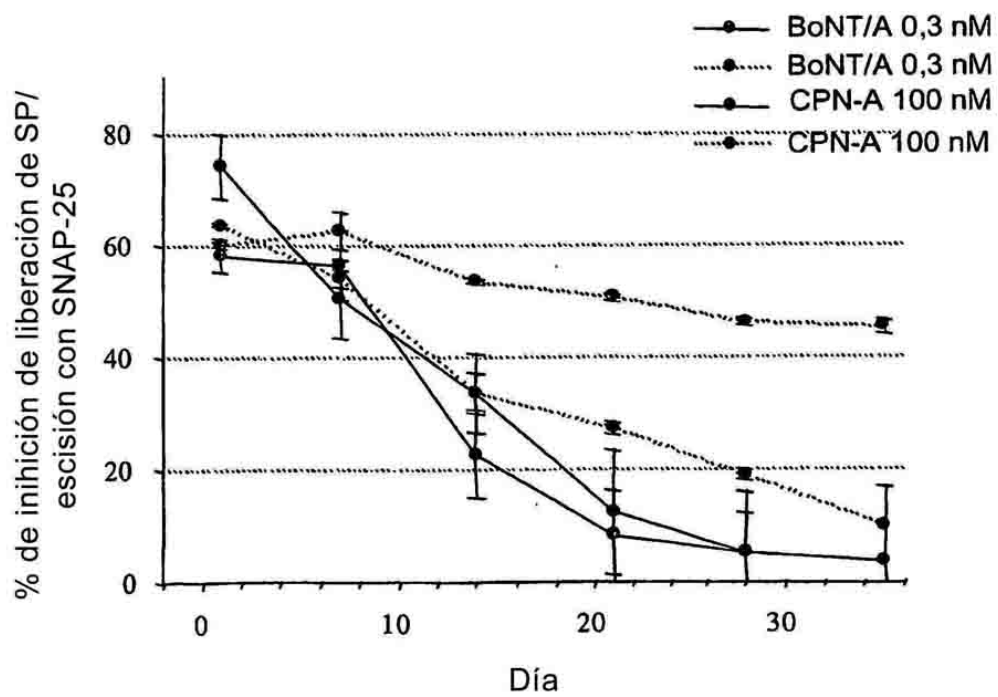


Figura 12

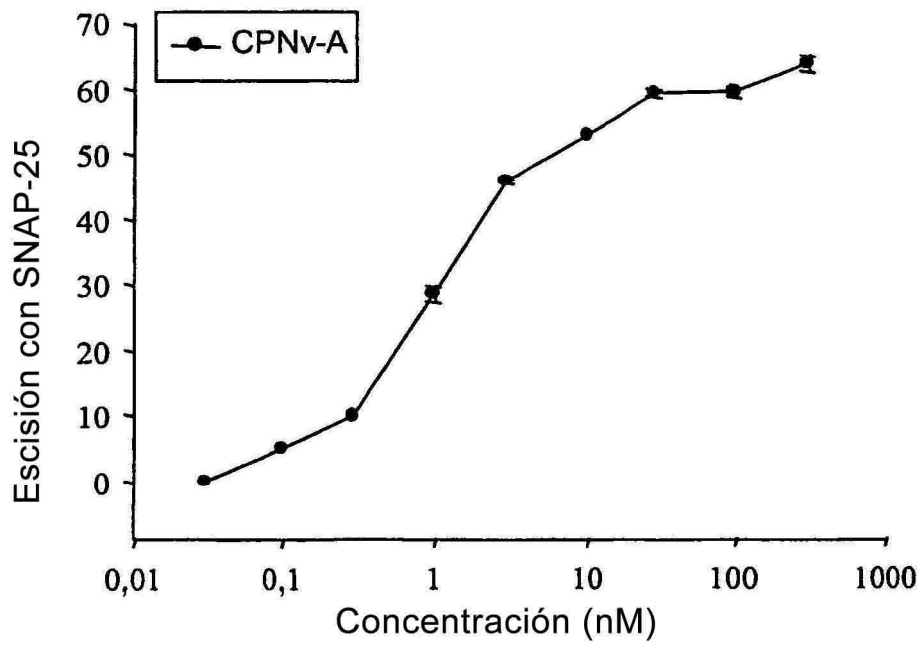


Figura 13

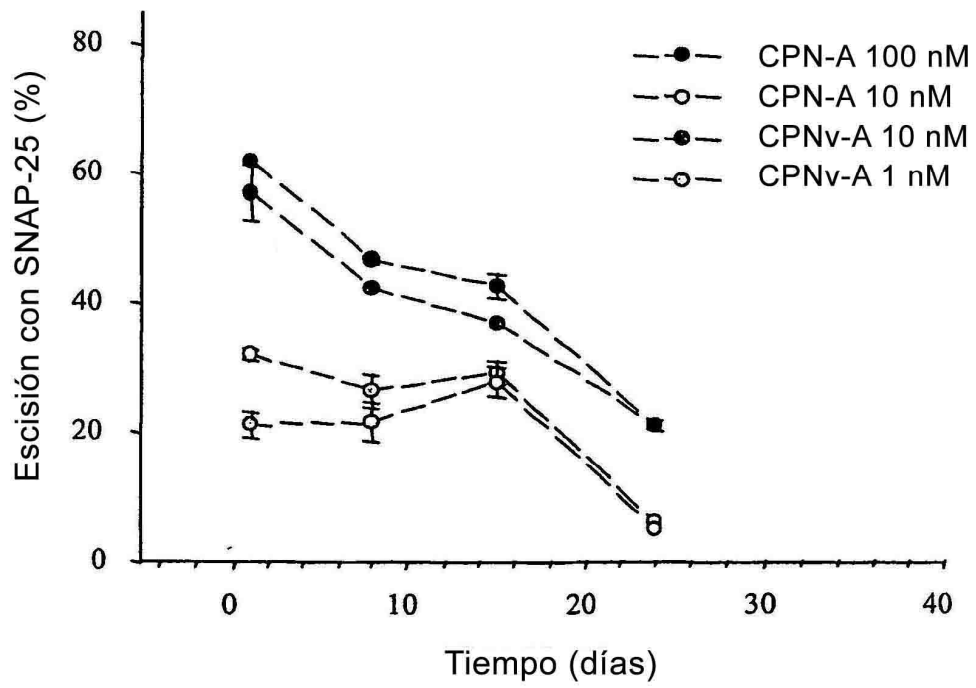


Figura 14

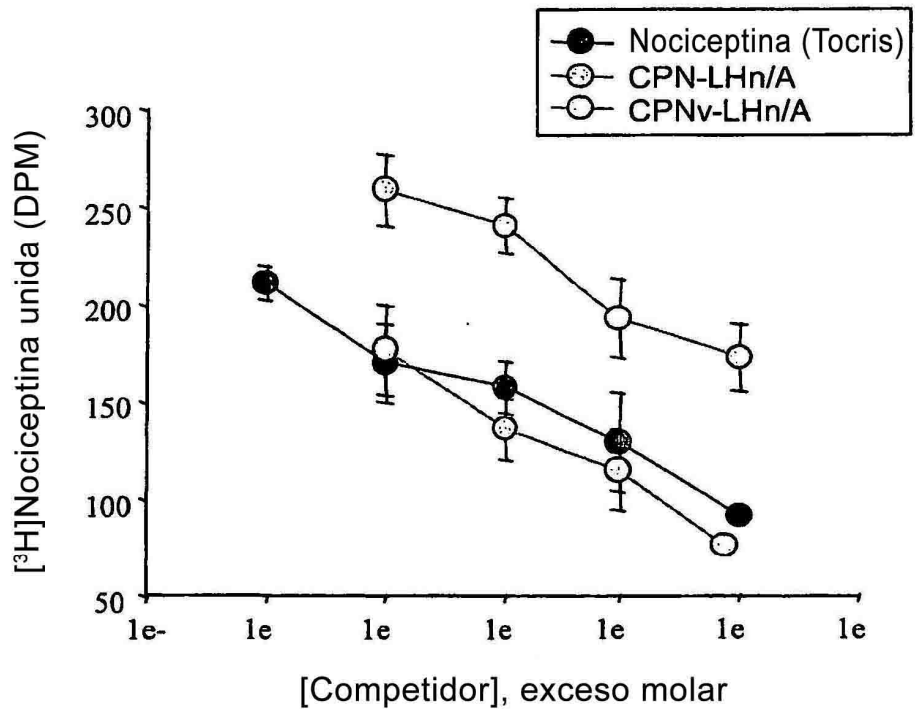
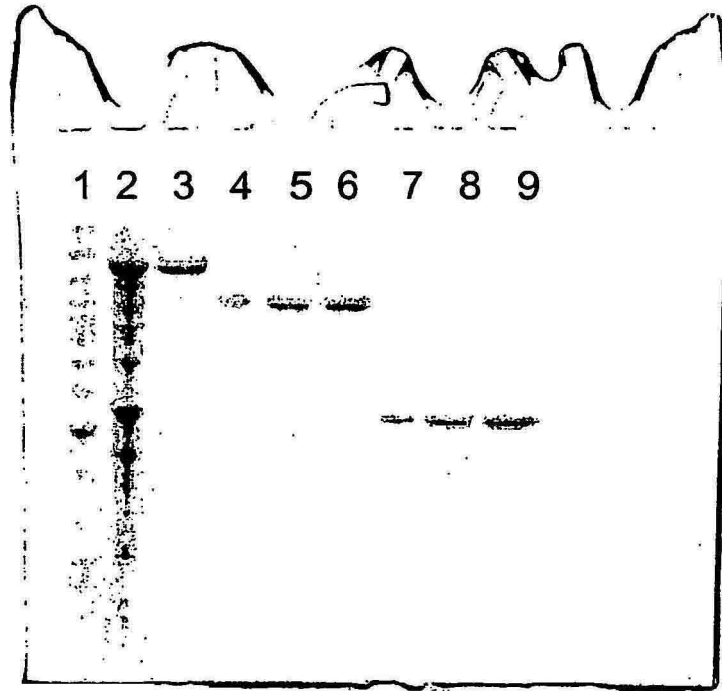


Figura 15



①

Figura 16

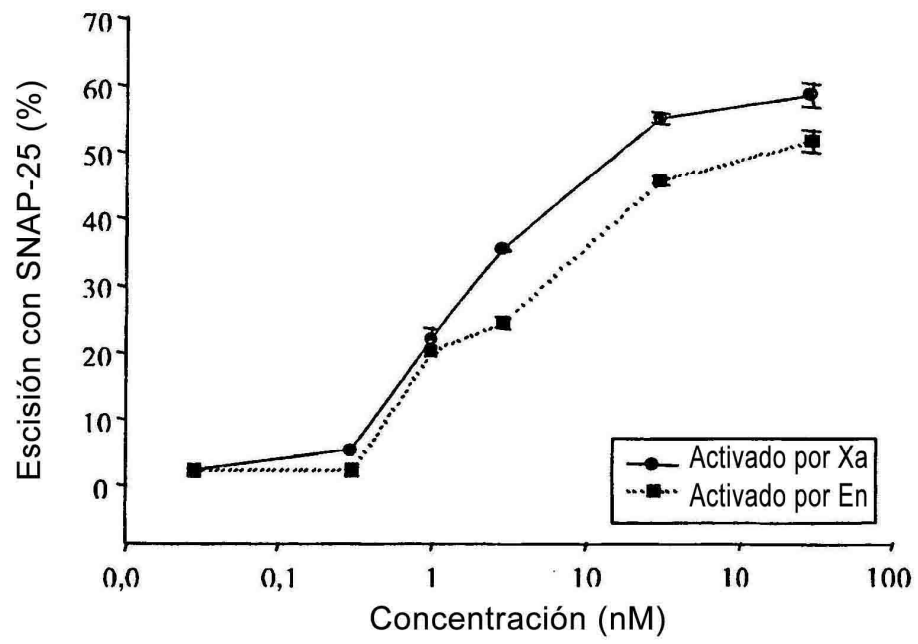


Figura 17

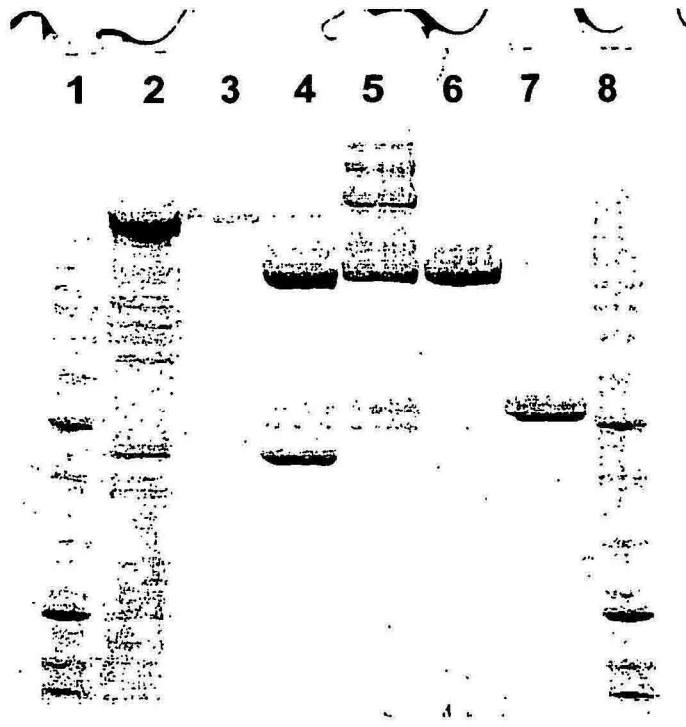


Figura 18

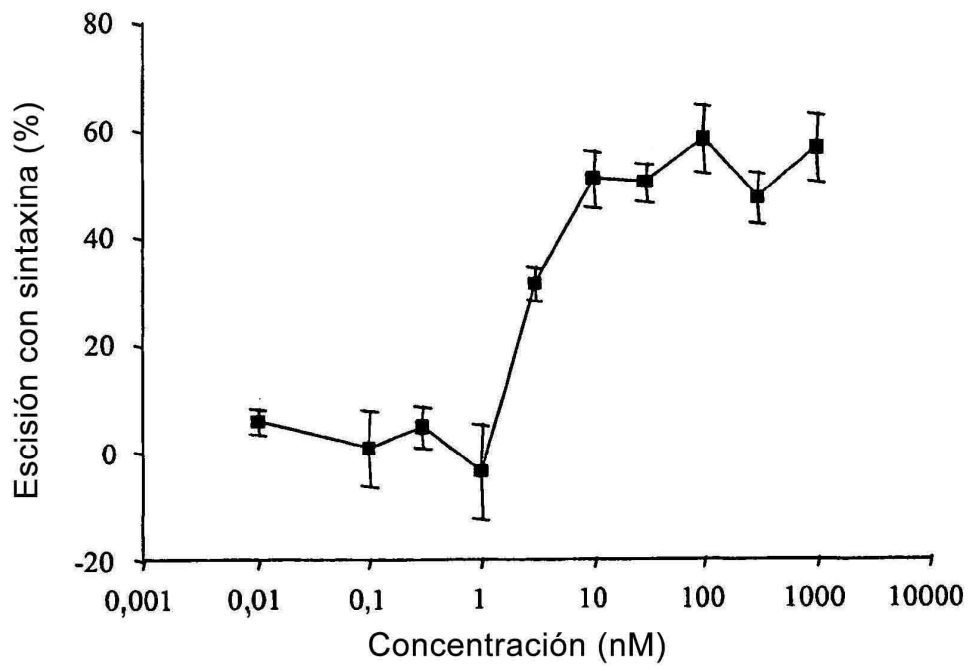


Figura 19

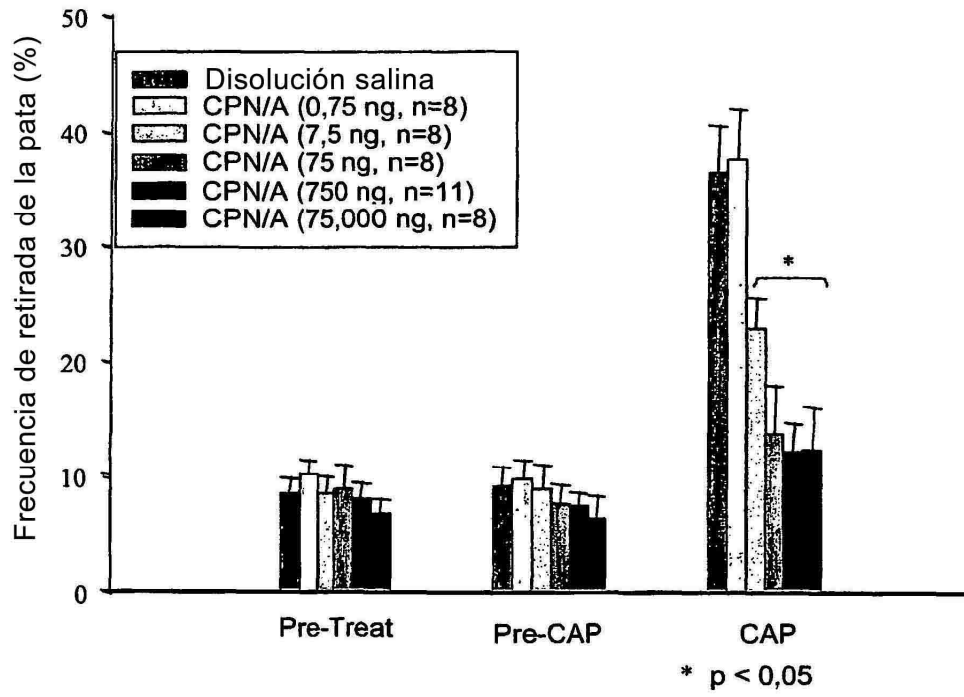


Figura 20

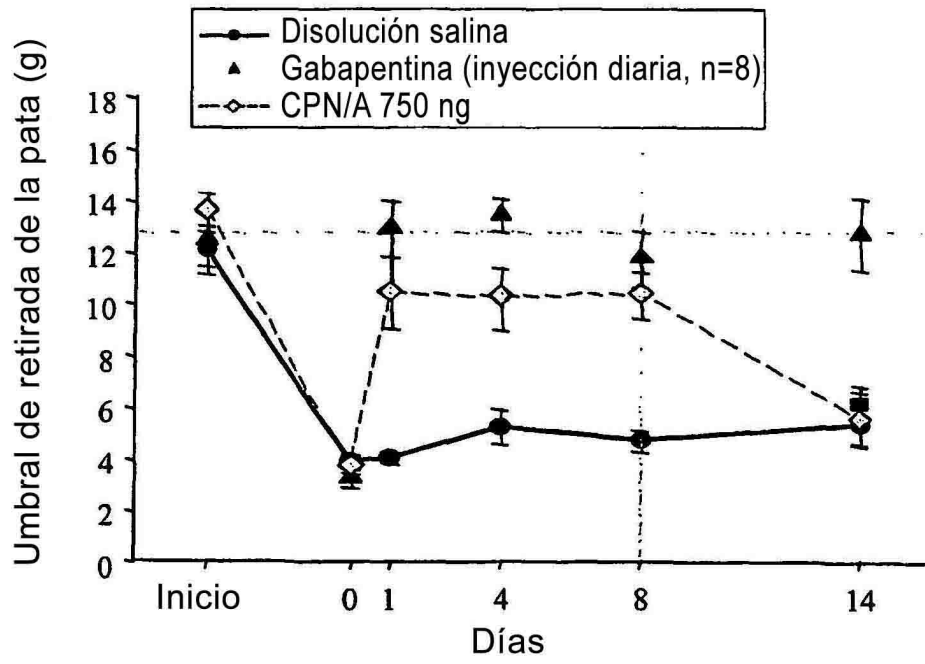


Figura 21

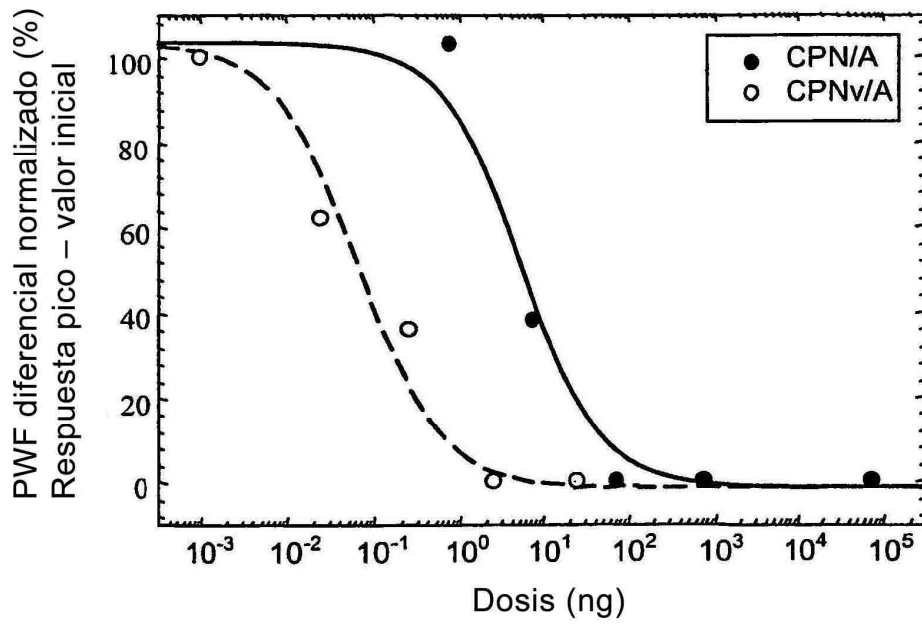


Figura 22

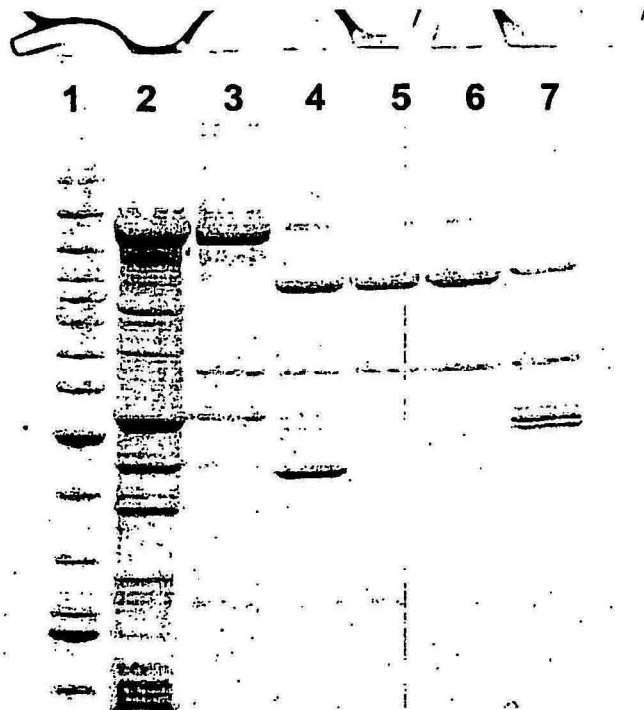


Figura 23

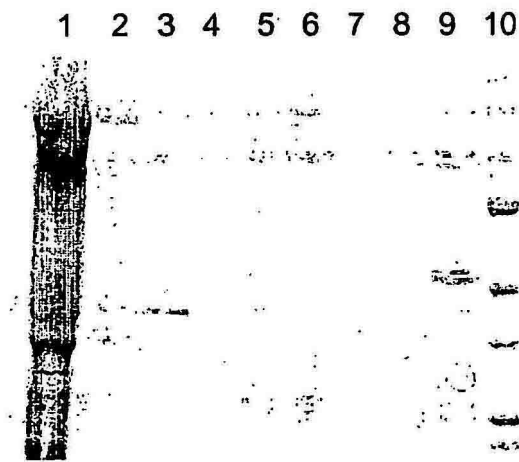


Figura 24

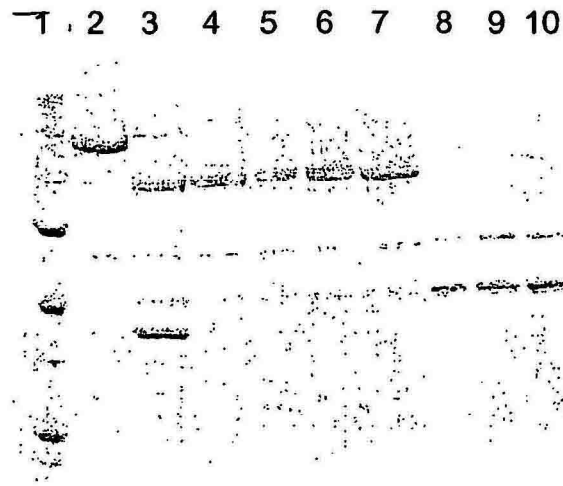


Figura 25

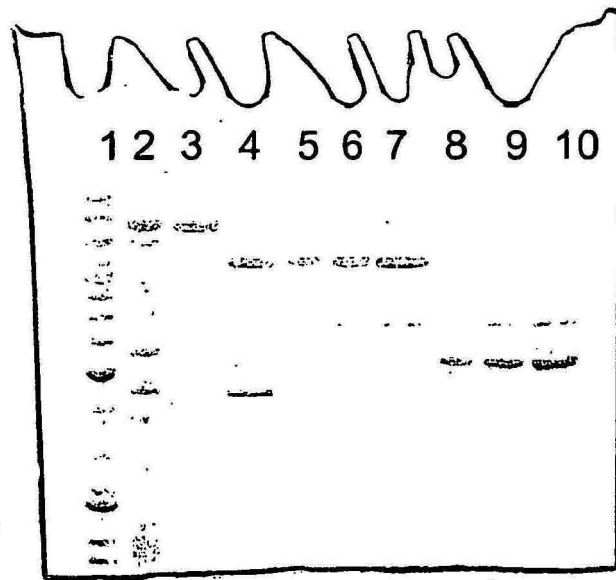


Figura 26

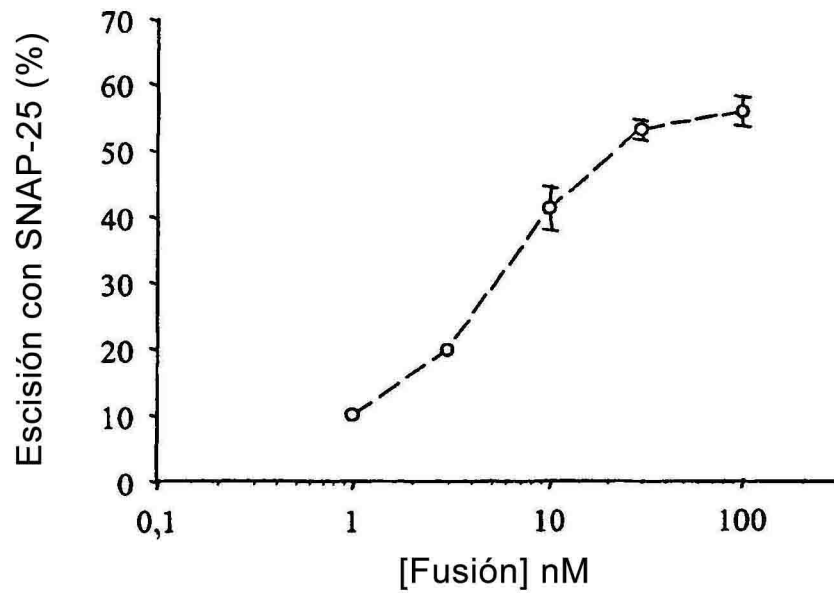


Figura 27

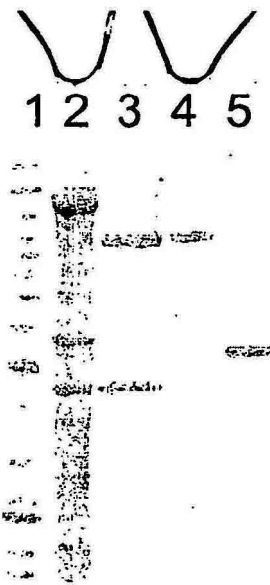


Figura 28

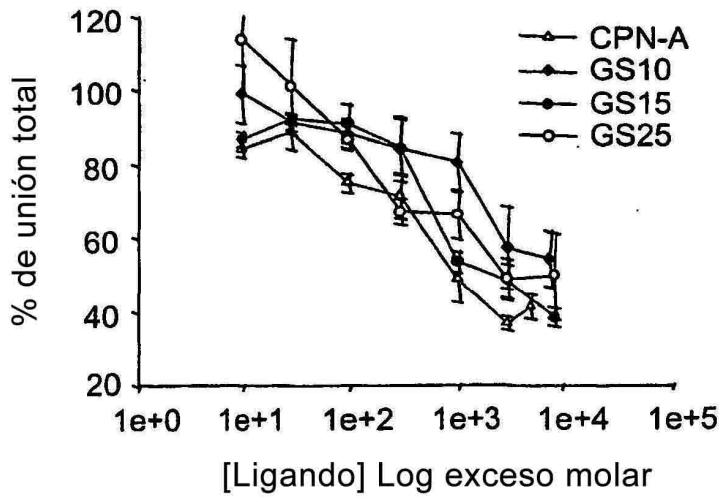
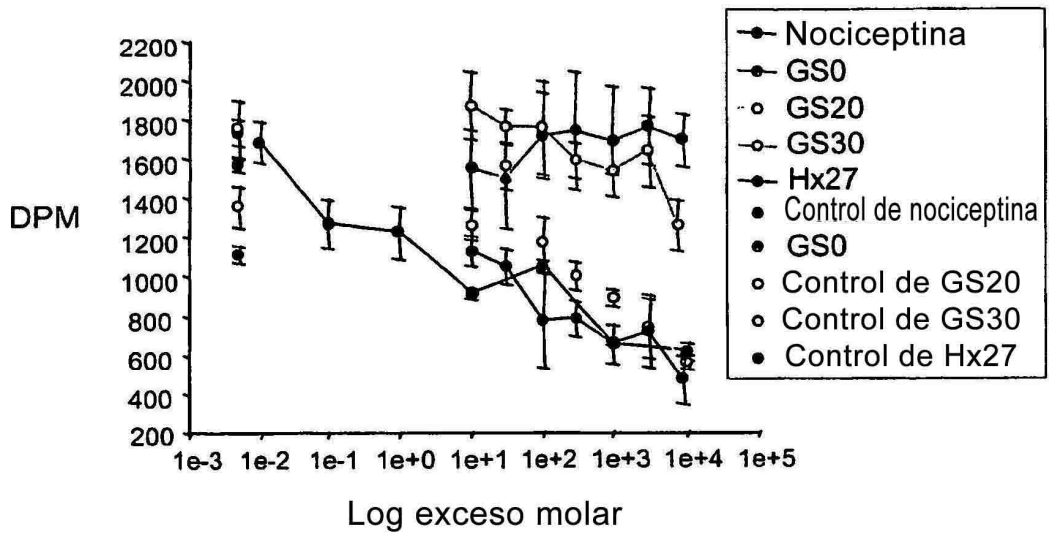


Figura 29

