



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 339 654**

51 Int. Cl.:

C12N 15/11 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

A61K 31/7088 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03779858 .4**

96 Fecha de presentación : **06.11.2003**

97 Número de publicación de la solicitud: **1556486**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **27.07.2005**

54 Título: **Enzimas de ADN activas y estables.**

30 Prioridad: **06.11.2002 DE 102 51 682**
15.05.2003 DE 103 22 662

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
24.05.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
24.05.2010

73 Titular/es: **Grünenthal GmbH**
Zieglerstrasse 6
52078 Aachen, DE

72 Inventor/es: **Schubert, Steffen;**
Kurreck, Jens;
Grünweller, Arnold y
Erdmann, Volker

74 Agente: **Aznárez Urbieto, Pablo**

ES 2 339 654 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

Enzimas de ADN activas y estables.

5 La presente invención se refiere a enzimas de ADN de tipo 10-23 que, gracias a la modificación de determinados nucleótidos en su secuencia núcleo, son especialmente estables y además presentan una eficiencia de disociación frente a su sustrato esencialmente igual o mayor que la de las enzimas de ADN no modificadas correspondientes. Otros objetos de la presente invención se refieren a células huésped que contienen la enzima de ADN según la invención. También se propone un medicamento que contiene las enzimas de ADN o las células huésped según la invención.
10 Las enzimas de ADN y los demás objetos están dirigidos principalmente contra el receptor vainilloide 1 (VR1) o picornavirus. Las células huésped son adecuadas como medicamentos o para la producción de medicamentos, en particular para el tratamiento del dolor y otros estados patológicos relacionados con el VR1.

15 Las enzimas de ADN disociadoras de ARN se desarrollaron a partir de ribozimas cabeza de martillo mediante experimentos de selección *in vitro*. En comparación con las especies de ARN, las enzimas de ADN son más fáciles de producir y además son más estables, sobre todo en tejidos biológicos. La enzima de ADN conocida de mayor eficiencia de disociación y mayor flexibilidad de reconocimiento de sustrato en el estado actual de la técnica es la denominada enzima de ADN de tipo "10-23" (Santoro y Joice (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 94: 4262-4266). La enzima de ADN de tipo 10-23 contiene un dominio catalítico (secuencia núcleo) de 15 nucleótidos flanqueado por dos dominios
20 o brazos de reconocimiento de sustrato, que incluyen en cada caso 7-10 nucleótidos (véase la Figura 1). La enzima de ADN de tipo 10-23 se une al sustrato de ARN mediante apareamiento de bases de acuerdo con las reglas de Watson-Crick a través de los brazos de reconocimiento de sustrato.

25 A pesar de la mayor estabilidad de las enzimas de ADN en comparación con las ribozimas, sobre todo para las aplicaciones *in vivo*, por ejemplo como medicamentos, es necesario estabilizar estas moléculas frente a ataques nucleolíticos.

30 Por ello, la presente invención tiene por objetivo, por una parte, proponer enzimas de ADN de tipo 10-23 que presenten una mayor estabilidad frente a la descomposición nucleolítica, siendo su actividad catalítica frente al sustrato de ARN correspondiente esencialmente igual, preferentemente mayor, que la de la enzima de ADN no estabilizada.

35 El tratamiento eficaz del dolor es uno de los grandes retos de la medicina molecular. El dolor agudo y transitorio es una importante señal del cuerpo para preservar a las personas contra daños graves producidos por el entorno o por una sobrecarga del cuerpo. En cambio, el dolor crónico, que perdura más que la causa del dolor y el tiempo previsible de curación, no tiene ninguna función biológica conocida. Cientos de millones de personas en todo el mundo padecen dolores crónicos. Sólo en la República Federal de Alemania, alrededor de 7,5 millones de personas sufren dolores crónicos. Actualmente, el tratamiento farmacológico, en particular del dolor crónico, es insatisfactorio. Con frecuencia, los analgésicos conocidos en el estado actual de la técnica no son lo suficientemente eficaces y, en
40 parte, presentan graves efectos secundarios.

45 Por ello, a menudo se buscan nuevas dianas (*targets*), estructuras endógenas, con los que parezca posible lograr un efecto modulador del dolor, por ejemplo principios activos de bajo peso molecular u otros compuestos tales como oligodesoxirribonucleótidos (ODN) antisentido, principalmente para el tratamiento del dolor crónico. El receptor vainilloide 1 (VR1) (también denominado receptor de capsaicina) clonado por Caterina y col. (1997) es un punto de partida prometedor para el desarrollo de nuevos medicamentos contra el dolor. Este receptor consiste en un canal de cationes expresado predominantemente por neuronas sensoriales primarias (Catarina y col. (1997), *supra*). El VR1 es activado por la capsaicina, un componente de los chiles, por la temperatura (> 43°C) y por un pH bajo (es decir, protones) debidos a lesiones tisulares y provoca una afluencia de calcio a las neuronas aferentes primarias. Los ratones "VR1-knockout" no desarrollan ninguna hiperalgesia térmica después de sufrir lesiones tisulares o inflamaciones
50 (Caterina y col. (2000) Science 288: 306-313; Davis y col., (2000) Nature 405: 183-187).

En el documento WO 02/18407 se dan a conocer ODN antisentido y también enzimas de ADN de tipo 10-23 incluidas dentro de este concepto, que conducen a la disociación del ARNm de VR1.

55 Por ejemplo Sioud y col. (J. Mol. Biol. (2000), 296, 937-947) presentan enzimas de ADN de tipo 10-23 que contienen nucleótidos de fosforotioato en la secuencia núcleo catalítica y en los brazos de reconocimiento de sustrato. Sin embargo, Sioud y col. (2000) no describen ninguna enzima de ADN contra el receptor vainilloide 1 (VR1). Del mismo modo, Sioud y col. (2000) no presentan ningún tipo de aplicación de las enzimas de ADN en el tratamiento del dolor o de otros estados patológicos relacionados con el VR-1.

60 El documento WO 02/18407 describe oligonucleótidos antisentido contra el VR-1 y también la utilización de estos oligonucleótidos en la terapia del dolor. Sin embargo, el documento WO 02/18407 tampoco describe ninguna enzima de ADN contra el receptor vainilloide 1 (VR-1) ni trata en general de la utilización de enzimas de ADN en el tratamiento del dolor o de otros estados patológicos relacionados con el VR-1.

65 Además, Warashina y col. (Chemistry & Biology, abril de 1999, 6, 237-250) presentan enzimas de ADN de tipo 10-23 parcialmente modificadas que contienen nucleótidos de fosforotioato o nucleótidos de 2'-O-metilo en el extremo 5' y en el extremo 3'. Sin embargo, al igual que en el caso de Sioud y col. (2000), las enzimas de ADN de

Warashina y col. (1999) sólo presentan una resistencia elevada contra nucleasas, pero no una actividad catalítica elevada. Warashina y col. (1999) tampoco describen ninguna enzima de ADN contra el receptor vainilloide 1 (VR-1), no muestra la utilización de enzimas de ADN en el tratamiento del dolor o de otros estados patológicos relacionados con el VR-1.

Por ello, la presente invención también tiene por objetivo proponer enzimas de ADN de tipo 10-23 que estén dirigidas contra el ARNm del receptor VR1 y que presenten una mayor estabilidad que los ODN dados a conocer en el estado actual de la técnica con una actividad catalítica comparable o superior.

Entre los picornavirus se encuentran agentes patógenos epidemiológicamente significativos, como rinovirus, numerosos enterovirus (entre otros ecovirus, los tres poliovirus, diferentes coxsackievirus), que provocan diferentes enfermedades, en particular en humanos, como resfriados (rinitis aguda) o inflamaciones crónicas graves de la cavidad nasofaríngea (rinopatías), poliomielitis, enfermedades cardíacas inflamatorias, meningitis vírica, etc. Por consiguiente, otro objetivo de la presente invención consiste en proponer enzimas de ADN de tipo 10-23 especialmente activas y estables contra los picornavirus.

Los objetivos arriba mencionados se resuelven mediante las formas de realización de la presente invención, caracterizadas en las reivindicaciones.

En particular se propone una enzima de ADN de tipo 10-23 (denominada en lo sucesivo “enzima de ADN”) que incluye, desde el extremo 5’ hacia el extremo 3’, un primer brazo de reconocimiento de sustrato (en lo sucesivo “sección I”), una secuencia núcleo catalítica (en lo sucesivo “sección II”) y un segundo brazo de reconocimiento de sustrato (en lo sucesivo “sección III”), estando modificados químicamente en la sección II únicamente uno o más de los nucleótidos 2, 7, 8, 11, 14 y 15 (que en total contiene preferentemente 15 nucleótidos), y seleccionándose el o los nucleótidos modificados de entre el grupo consistente en nucleótidos de fosforotioato, timidina invertida, ribonucleótidos de 2’-O-metilo y ribonucleótidos de LNA.

La presente invención se basa en la comprobación sorprendente de que se pueden introducir nucleótidos modificados químicamente de forma adecuada en enzimas de ADN, en particular enzimas de ADN contra VR1 o picornavirus, en la secuencia núcleo en las posiciones 2, 7, 8, 11, 14 y/o 15, y, como se describe más detalladamente más abajo, también se pueden introducir en los brazos de reconocimiento de sustrato (secciones I y III), en caso dado adaptando la longitud de estos brazos de reconocimiento de sustrato, para obtener así enzimas de ADN estabilizadas que no presentan ninguna reducción significativa de la actividad catalítica o que incluso presentan una actividad catalítica mejorada frente al sustrato de ARN correspondiente.

De acuerdo con la invención, el concepto “nucleótido modificado” significa que el nucleótido en cuestión está modificado químicamente. Los especialistas entienden por el concepto “modificación química” que el nucleótido modificado ha sido cambiado por sustitución, adición o eliminación de uno o más átomos o grupos de átomos en comparación con los nucleótidos naturales. Por consiguiente, de acuerdo con la invención, la modificación química de un nucleótido puede afectar a la ribosa (por ejemplo ribonucleótidos de 2’-O-metilo, los denominados ribonucleótidos “Locked Nucleic Acid” (LNA) (ácido nucleico bloqueado) y timidina invertida), al enlace (di)éster fosfórico (por ejemplo fosforotioatos, fosforoamidatos, metilfosfonatos y nucleótidos de péptidos) y/o a la base (por ejemplo 7-desazaguanosina, 5-metilcitosina e inosina).

Algunos nucleótidos modificados preferentes según la presente invención son, por ejemplo, nucleótidos de fosforotioato, timidina invertida, ribonucleótidos de 2’-O-metilo y ribonucleótidos de LNA. Estas modificaciones según la invención están representadas a modo de ejemplo en la Figura 2.

Como se muestra en la Figura 2, los LNA son ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos que contienen un puente metileno que une el oxígeno 2’ de la ribosa con el carbono 4’. Por ejemplo, Braasch y Corey (2001) ofrecen una idea general sobre los LNA en Chem. Biol. 8: 1-7. Los LNA se pueden adquirir en el comercio, por ejemplo de la firma Prologo, Boulder, CO, EE. UU. Los fosforotioatos se pueden adquirir por ejemplo de MWG-Biotech AG, Ebersberg, Alemania. Los ribonucleótidos modificados con 2’-O-metilo se pueden obtener en IBA-NAPS, Göttingen, Alemania, entre otros lugares.

En algunas enzimas de ADN preferentes de la presente invención, todos los nucleótidos 2, 7, 8, 11, 14 y 15 de la sección II (secuencia núcleo) están modificados, seleccionándose el o los nucleótidos modificados de entre el grupo consistente en nucleótidos de fosforotioato, timidina invertida, ribonucleótidos de 2’-O-metilo y ribonucleótidos de LNA.

Otro objeto de la presente invención consiste en enzimas de ADN en las que adicionalmente uno o más nucleótidos de los dominios de reconocimiento de sustrato (o brazos de reconocimiento de sustrato), es decir, de la sección I y/o la sección III, están modificados, en particular mediante fosforotioato, timidina invertida, 2’-O-metil-ribosa y ribonucleótidos de LNA. Algunas formas de realización preferentes de la presente invención consisten en enzimas de ADN en las que las modificaciones de la definición arriba indicada se encuentran en la sección II (secuencia núcleo catalítica) y en las secciones I y/o II.

En otras formas de realización preferentes de la enzima de ADN según la invención, todos los nucleótidos de la sección I y/o la sección III, en particular todos los nucleótidos de las dos secciones, están modificados, siendo especialmente preferente que todos los nucleótidos estén modificados mediante fosforotioato o 2'-O-metil-ribosa.

Además, preferentemente más de 3, en especial de 3 a 7, de forma especialmente preferente de 3 a 6 y en particular de 3 a 5 nucleótidos de la sección I y/o de la sección III, preferentemente de las dos secciones, están modificados. Si los nucleótidos modificados se encuentran en el extremo 5' de la sección I y/o en el extremo 3' de la sección III, es decir, en los extremos de la enzima de ADN, resultan configuraciones especialmente preferentes de la enzima de ADN según la invención. En este contexto, los nucleótidos modificados son preferentemente ribonucleótidos de 2'-O-metilo o de LNA.

Los ribonucleótidos de 2'-O-metilo y de LNA son modificaciones especialmente preferentes según la presente invención, ya que estos nucleótidos producen una mayor afinidad de la enzima de ADN por el sustrato. Principalmente en caso de un exceso de sustrato (es decir, en caso de las llamadas condiciones "*múltiple turnover*" (renovación múltiple)), como el encontrado para la eficacia de la enzima de ADN según la invención bajo condiciones *in vivo*, la afinidad de la enzima por el sustrato no debería ser demasiado alta, ya que, de lo contrario, la liberación de producto determina la cinética. Una medida para la afinidad de la enzima de ADN según la invención es su punto de fusión con el sustrato. A este respecto, de acuerdo con la invención se ha comprobado que se observa una velocidad óptima algo por encima de la temperatura de reacción (37°C), por ejemplo en caso de enzimas de ADN dirigidas contra VR1 y rinovirus 14. Por consiguiente, de acuerdo con la invención se pueden obtener configuraciones especialmente ventajosas de la enzima de ADN si, con una molécula diana dada, la temperatura de fusión se ajusta correspondientemente mediante la variación de los nucleótidos modificados, el tipo de modificación y/o la longitud de los brazos de reconocimiento de sustrato (secciones I y III). Preferentemente, la temperatura de fusión de las cadenas dobles formadas entre las secciones I y III de la enzima de ADN según la invención y las secuencias diana correspondientes oscila entre aproximadamente 33 y aproximadamente 45°C, de forma especialmente preferente entre aproximadamente 35 y aproximadamente 42°C, principalmente entre aproximadamente 37 y aproximadamente 40°C, en particular aproximadamente 39°C.

En este contexto se ha comprobado principalmente que se pueden obtener formas de realización preferentes de la enzima de ADN según la invención si la sección I y/o la sección III, en particular las dos secciones, no incluyen más de 8 nucleótidos, en particular no más de 7 nucleótidos.

Algunas enzimas de ADN totalmente preferentes son especies con las longitudes de los brazos de reconocimiento de sustrato y las modificaciones mostradas más abajo. El primer número indica la longitud de los brazos de reconocimiento de sustrato y el segundo número la cantidad de nucleótidos modificados, que se encuentran preferentemente en el extremo de los brazos, y OMe designa ribonucleótidos de 2'-O-metilo y LH designa ribonucleótidos de LNA:

OMe9-4, OMe8-4, OMe7-3, OMe7-4, OMe7-5, OMe7-6, OMe7-7, OMe6-5, LH9-4, LH7-3 y LH7-4.

La secuencia de bases de los dominios núcleo con actividad catalítica de la enzima de ADN, que ha sido desarrollada por Santoro y Joyce (1997), *supra*, desde el extremo 5' hacia el extremo 3', es la siguiente: GGCTAGCTACAACGA (véase la Figura 1). De acuerdo con la invención también se ha comprobado que las bases de la secuencia núcleo son flexibles, en particular en las posiciones 7 a 12, pudiendo incluso suprimirse la timidina de la posición 8. A partir de estos conocimientos se deduce que la enzima de ADN en la sección II desde el extremo 5' hacia el extremo 3' puede presentar la siguiente secuencia consenso: GGMTMGH(N)DNNNMGD.

En este contexto, M = A o C; H = A, C o T; D = G, A o T; y N = cualquier base (natural). Los nucleótidos entre paréntesis pueden no estar presentes.

La enzima de ADN según la invención no tiene ninguna limitación en cuanto al sustrato. Por ello, la enzima de ADN se puede utilizar en principio contra todas las moléculas de ARNm, otros ARN, como ARN virales, viroides, etc. Las secuencias diana son aquellas que presentan el motivo de disociación de las enzimas de ADN 10-23, es decir, un motivo purina/pirimidina. Las secuencias diana preferentes incluyen un motivo GU, ya que las secuencias GU de las enzimas de ADN se disocian de forma particularmente eficaz.

Preferentemente, la enzima de ADN según la invención está dirigida contra el ARNm del receptor vainilloide 1 (VR1), en particular de mamíferos como humanos, simios, perros, gatos, ratas, ratones, conejos, cobayas, hámster, bovinos, cerdos, ovejas y cabras.

ES 2 339 654 T3

A continuación se muestran las secuencias de bases específicas de las secciones I y III (desde 5' hacia 3'), siendo también posible en caso dado una secuencia diferente a éstas en un nucleótido con la condición de que el nucleótido que difiere de las secuencias indicadas no se encuentre en una de las tres últimas posiciones de la sección I ni en una de las tres primeras posiciones de la sección III: (N = cualquier base o cualquier nucleótido)

5	Sección I	Sección III
	GTCATGA	GGTTAGG
10	TGTCATGA	GGTTAGGG
	ATGTCATGA	GGTTAGGGG
15	GTCGTGG	GATTAGG
	TGTCGTGG	GATTAGG
	ATGTCGTGG	GATTAGG
20	TTGTTGA	GGTCTCA
	CTTGTTGA	GGTCTCAC
25	TCTTGTTGA	GGTCTCACC
	TTGTTGA	AGTCTCA
	CTTGTTGA	AGTCTCAN
30	TCTTGTTGA	AGTCTCANN
	GGCCTGA	CTCAGGG
	CGGCCTGA	CTCAGGGA
35	TCGGCCTGA	CTCAGGGAG
	TGCTTGA	CGCAGGG
40	CTGCTTGA	CGCAGGGN
	TCTGCTTGA	CGCAGGGNN
	GTGTGGA	TCCATAG
45	GGTGTGGA	TCCATAGG
	TGGTGTGGA	TCCATAGGC
	ACGTGGA	TCAGACG
50	GACGTGGA	TCAGACGN
	CGACGTGGA	TCAGACGNN
55	GTGGGGA	TCAGACT
	GGTGGGGA	TCAGACTC
	GGGTGGGGA	TCAGACTCC
60	GTGGGTC	GCAGCAG
	AGTGGGTC	GCAGCAG
65	GAGTGGGTC	GCAGCAG

	CGCTTGA	AAATCTG
	GCGCTTGA	AAATCTGT
5	TGCGCTTGA	AAATCTGTC
	CGCTTGA	GAATCTG
	GCGCTTGA	GAATCTGN
10	TGCGCTTGA	GAATCTGNN
	CTCCAGA	ATGTGGA
15	GCTCCAGA	ATGTGGAA
	AGCTCCAGA	ATGTGGAAT
	CTCCAGG	AGGTGGA
20	GCTCCAGG	AGGTGGA
	AGCTCCAGG	AGGTGGA
25	GGTACGA	TCCTGGT
	GGGTACGA	TCCTGGTA
	CGGGTACGA	TCCTGGTAG
30	GGTGCGG	TCTTGGC
	GGGTGCGG	TCTTGGC
35	CGGGTGCGG	TCTTGGC

Otras enzimas de ADN preferentes de la presente invención están dirigidas contra ARN-virus, en particular contra picornavirus, tal como se da a conocer por ejemplo en Kayser y col., Medizinische Mikrobiologie, 8ª edición, editorial Thieme, Stuttgart, 1993, (por ejemplo virus de la hepatitis A; enterovirus humanos como poliovirus, coxsackievirus y ecovirus; enterovirus animales, como el virus Tschen patógeno para los cerdos; rinovirus humanos como el rinovirus 14, etc (los especialistas conocen más de 80 tipos); rinovirus animales, como el virus de la fiebre aftosa; y calicivirus, como el virus del exantema vesicular de los cerdos).

El ARN diana preferente se deriva por ejemplo del rinovirus 14 (preferentemente humano), siendo algunas formas de realización especialmente ventajosas de la enzima de ADN de la presente invención en las secciones I y III complementarias, al menos en parte, a la región 5' no traducida (5'-UTR). Esta región incluye una secuencia consenso que en numerosos picornavirus está conservada con un grupo I IRES. A continuación se muestran ejemplos específicos de secuencias según la invención, desde 5' hacia 3', dirigidas contra el rinovirus 14 humano y otros picornavirus, en particular aquellos que incluyen un grupo I IRES, siendo también posible en caso dado una secuencia diferente a éstas en un nucleótido con la condición de que el nucleótido que difiere de las secuencias indicadas no se encuentre en una de las tres últimas posiciones de la sección I ni en una de las tres primeras posiciones de la sección III: (N = cualquier base o cualquier nucleótido)

55	Sección I	Sección III
	GTGGGA	TTTAAGG
60	GGTGGGA	TTTAAGGA
	GGGTGGGA	TTTAAGGAA

De acuerdo con la invención se ha comprobado sorprendentemente que los objetos de la invención inhiben la expresión de VR1 con mayor intensidad que los oligonucleótidos antisentido habituales.

Otro objeto de la presente invención se refiere a células huésped, excepto gametos humanos y células madre embrionarias humanas, que se transforman con al menos una enzima de ADN según la invención. Las enzimas de ADN según la invención se pueden introducir en la célula huésped correspondiente a través de los métodos habituales, por ejemplo transformación, transfección, transducción, electroporación o pistola genética. Como células huésped entran en consideración todas las células procarióticas o eucarióticas, por ejemplo de bacterias, hongos, levaduras, células vegetales o animales. Algunas células huésped preferentes son células bacterianas como *Escherichia coli*, *Streptomyces*, *Bacillus* o *Pseudomonas*, microorganismos eucarióticos como *Aspergillus* o *Saccharomyces cerevisiae* o levaduras de panadería usual (Stinchcomb y col. (1997) Nature 282: 39).

Sin embargo, en una forma de realización preferente, para la transformación mediante enzimas de ADN según la invención se eligen células de organismos multicelulares. En principio, como célula huésped se puede utilizar cualquier cultivo celular eucariótico superior, aunque son especialmente preferentes las células de mamíferos, por ejemplo de simio, rata, hámster, ratón o humano. Los especialistas conocen numerosas líneas celulares establecidas. En un listado, que de ningún modo es definitivo, se mencionan las siguientes líneas celulares: 293T (línea celular renal embrionaria) (Graham y col., J. Gen. Virol. 36: 59 (1997), BHK (células renales de hámster recién nacido), CHO (células de ovario de hámster, Urlaub y Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 77: 4216, (1980)), HeLa (células de carcinoma humano) y otras líneas celulares establecidas, en particular para uso en laboratorio, por ejemplo células HEK293, SF9 o COS. De forma totalmente preferente se emplean células humanas, en particular células madre neuronales y células de la "vía del dolor", preferentemente neuronas sensoriales primarias. Algunas células humanas, en particular células autólogas de un paciente, después de la transformación (sobre todo *ex vivo*) con enzimas de ADN según la invención son totalmente adecuadas como medicamentos, por ejemplo con fines de terapia genética; es decir, después de realizar una extracción de células, en caso dado una extracción *ex vivo*, transformación, selección y finalmente trasplante en el paciente.

La combinación de una célula huésped y una enzima de ADN según la invención adecuada para la célula huésped constituye un sistema que puede servir para la aplicación de las enzimas de ADN según la invención.

Por consiguiente, los objetos de la invención son adecuados como medicamentos, por ejemplo para inhibir la nocicepción, por ejemplo mediante la reducción de la expresión del receptor VR1 mediante las enzimas de ADN según la invención.

En consecuencia, la presente invención también incluye la utilización de los objetos arriba mencionados para el tratamiento del dolor o para producir un medicamento para el tratamiento y/o la prevención del dolor, en particular del dolor agudo o crónico, y también su utilización para el tratamiento o para producir un medicamento para el tratamiento de trastornos de sensibilidad relacionados con el receptor VR1, por ejemplo para el tratamiento de hiperalgesias, neuralgias y mialgias y de todas las enfermedades y síntomas de enfermedades relacionadas con el VR1, en particular incontinencia urinaria, síntomas neurógenos de la vejiga, prurito, tumores e inflamaciones.

Los medicamentos según la invención, o los medicamentos producidos utilizando los objetos de la invención, contienen en caso dado, además de los objetos arriba definidos, una o más sustancias auxiliares y/o aditivos adecuados. Los medicamentos según la invención se pueden administrar como medicamentos líquidos en forma de soluciones para inyección, gotas o jugos, como medicamentos semisólidos en forma de granulados, tabletas, pellets, parches, cápsulas, apósitos o aerosoles y, además de al menos uno de los objetos de la invención, dependiendo de la forma galénica, también pueden contener en caso dado materiales vehículo, sustancias de carga, disolventes, diluyentes, colorantes y/o aglutinantes. La selección de los materiales auxiliares y de las cantidades a utilizar de los mismos depende de la forma de administración del medicamento, es decir, por vía oral, peroral, parenteral, intravenosa, intraperitoneal, intradérmica, intramuscular, intranasal, bucal, rectal o tópica, en las mucosas, los ojos, etc. Para la administración oral son adecuados los preparados en forma de tabletas, grageas, cápsulas, granulados, gotas, jugos y jarabes, y para la administración parenteral, tópica y por inhalación son adecuadas las soluciones, suspensiones, preparados secos de fácil reconstitución y aerosoles. Los objetos de la invención en un depósito, en forma disuelta o en un apósito, dado el caso añadiendo agentes promotores de la penetración en la piel, son preparados adecuados para la administración percutánea. Los preparados a utilizar por vía oral o percutánea pueden liberar los objetos de la invención de forma retardada. La cantidad de principio activo a administrar a los pacientes varía en función del peso del paciente, del tipo de administración, de la indicación y del grado de la enfermedad. Normalmente se administran de 2 a 500 mg/kg de peso corporal de al menos un objeto de la invención. Si el medicamento se ha de utilizar principalmente para la terapia genética, como sustancias auxiliares o aditivos adecuados son recomendables, por ejemplo, una solución fisiológica de sal común, estabilizadores, inhibidores de proteasa, ADNsa, etc.

Sustancias auxiliares y/o aditivos adecuados son por ejemplo lípidos, lípidos catiónicos, polímeros, liposomas, ácidos nucleicos aptámeros, péptidos y proteínas (por ejemplo tet.-transportina, transferrina, albúmina o ferritina), por ejemplo aquellos que están unidas a ADN o ARN (o moléculas de ADN-péptido sintéticas), por ejemplo para aumentar la introducción de ácidos nucleicos en la célula, para dirigir la mezcla de medicamentos únicamente a un subgrupo de células, para evitar la descomposición del ácido nucleico según la invención en la célula, para facilitar el almacenamiento de la mezcla de medicamentos antes de su utilización, etc. Como ejemplos de péptidos y proteínas o moléculas de ADN-péptido sintéticas se mencionan: anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, ligandos, moléculas de adhesión, que en cada caso pueden estar modificados o no modificados. Por ejemplo, sustancias auxiliares que estabilizan las enzimas de ADN en la célula son, por ejemplo, sustancias condensadoras de ácido nucleico como polímeros catiónicos, poli-L-lisina o polietilenimina.

En caso de una administración local de los objetos de la invención, por ejemplo de las enzimas de ADN según la invención, la administración tiene lugar mediante inyección, catéter, supositorio, aerosoles (*spray* nasal o bucal, inhalación), trocates, proyectiles, geles plurónicos, polímeros que liberan los medicamentos de forma continua, o cualquier otro dispositivo que posibilite un acceso local. La administración *ex vivo* de la mezcla de medicamentos según la invención, que se utiliza para el tratamiento de las indicaciones arriba mencionadas, también permite un acceso local.

En caso dado, los objetos de la invención se pueden combinar en una composición como una mezcla de medicamentos (principios activos), por ejemplo con al menos otro analgésico o antiviral y/u otro medio adecuado para el tratamiento de enfermedades relacionadas con infecciones (rino)virales.

De este modo, los objetos de la invención se pueden combinar por ejemplo con opiáceos y/u opioides sintéticos (por ejemplo morfina, levometadona, codeína, tramadol, buprenorfina) y/o NSAID (por ejemplo diclofenaco, ibuprofeno, paracetamol), por ejemplo en una de las formas de administración dadas a conocer arriba mencionadas, o también en el curso de una terapia combinada en formas de administración independientes en cada caso, dado el caso con una confección diferente, en un plan de terapia con una estructuración médica conveniente y adaptado a las necesidades del paciente correspondiente. Preferentemente, estas composiciones se utilizan como mezclas de medicamentos, por ejemplo con analgésicos establecidos para el tratamiento (o para la producción de medicamentos para el tratamiento) de las indicaciones médicas arriba mencionadas.

Las enzimas de ADN según la invención se pueden producir de acuerdo con procedimientos conocidos por los especialistas. Los nucleótidos correspondientes se sintetizan por ejemplo según el método de síntesis de Merrifield en un soporte insoluble (H.G. Gassen y col. (1982), Chemical and Enzymatic Synthesis of Genefragments, Editorial Chemie, Weinheim) o de otro modo (Beyer y Walter (1984) Lehrbuch der organischen Chemie, página 816 y siguientes, 20 Edición, Editorial S. Hirzel, Stuttgart). Los objetos según la invención también se pueden sintetizar *in situ* sobre vidrio, plástico o metal, por ejemplo oro, mediante métodos conocidos.

Otro objeto de la presente invención se refiere a un procedimiento *ex vivo* para inhibir la expresión de un gen, que incluye la introducción de la enzima de ADN arriba definida en una célula que expresa el gen en cuestión. Un gen diana preferente del procedimiento según la invención es el gen VR1, en cuyo caso en la célula se introduce correspondientemente una enzima de ADN dirigida contra el ARNm del VR1.

La introducción de los objetos de la invención en la célula puede llevarse a cabo del modo arriba descrito.

Las figuras muestran:

Figura 1: representación esquemática de una enzima de ADN de tipo 10-23 de acuerdo con Santoro y col. (1997), *supra*, (figura 2, página 4264) (incluyendo sustrato de ARN). La cadena superior, indicada con una flecha, es la cadena de ARN a disociar, señalando la flecha el lugar de disociación. La cadena inferior es una representación de la enzima de ADN. En relación con las formas de realización preferentes de la enzima de ADN según la invención, en la cadena superior Y = U y R = G. Por consiguiente, el lugar de disociación de la cadena superior es un, así llamado, lugar de disociación GU, que las enzimas de ADN disocian de forma especialmente eficaz. Correspondientemente, en la cadena inferior R = A. A éste le siguen, hacia el extremo 5', por ejemplo los otros nucleótidos de las secciones I arriba definidas. En la sección III, a la A no emparejada contigua a la sección III le siguen directamente, desde la dirección del extremo 5' hacia el extremo 3', los nucleótidos de la segunda parte de la enzima de ADN complementaria al sustrato de ARN, por ejemplo las secuencias arriba mencionadas. Por consiguiente, las secciones I y III se unen al sustrato y por ello se designan como brazos de reconocimiento de sustrato de la enzima de ADN.

Figura 2: muestra las estructuras de los nucleótidos de fosforotioato, timidina invertida, nucleótidos de 2'-O-metilo y ribonucleótidos de LNA.

Figura 3: muestra, según la representación correspondiente a la Figura 1, la estructura general de una enzima de ADN de tipo 10-23 con la secuencia consenso según la invención de la sección II (secuencia núcleo catalítica). Los nucleótidos no esenciales, que pueden ser sustituidos por cualquier otro nucleótido sin ninguna pérdida esencial de actividad, están designados con N, N' representa cada nucleótido complementario a N. R designa un nucleótido que preferentemente contiene una base purina. Y representa un nucleótido que preferentemente contiene una base pirimidina. R' representa un nucleótido complementario a Y, que contiene una purina. M representa A o C; H representa A, C o T; y D representa G, A o T. La región que probablemente interviene directamente en la formación del centro catalítico está marcada con una línea de puntos. En cada caso se indican los grupos funcionales exocíclicos necesarios para la actividad de la enzima de ADN.

Figura 4: muestra una representación gráfica de las actividades relativas de enzimas de ADN modificadas contra la 5'-UTR del rinovirus 14 humano (DH 5), en cada caso con un exceso décuplo de enzimas de ADN (condiciones "single turnover" (renovación simple), STO, barra izquierda en cada caso) y un exceso décuplo de sustrato (condiciones "multiple turnover" MTO, barra derecha en cada caso). Las actividades están normalizadas con respecto a la enzima de ADN no modificada con brazos de reconocimiento de sustrato de 9 nucleótidos de longitud. Las enzimas de ADN

indicadas presentaban las siguientes modificaciones: fosforotioato (Thio), timidina invertida (iT), ARN de 2-O-metilo (OMe) y LNA (LH). El primer número representa la longitud de los brazos de reconocimiento de sustrato, mientras que el segundo número indica la cantidad de nucleótidos modificados en el extremo de los brazos. CM6 es una enzima de ADN según la invención en la que los nucleótidos 2, 7, 8, 11, 14 y 15 de la secuencia núcleo están modificados (ribonucleótidos de 2'-O-metilo). CM12 es un constructo comparativo en la que 12 nucleótidos de la secuencia núcleo (todos excepto las posiciones 3, 5 y 10) están modificados. DH 5-9 designa la enzima de ADN no modificada contra la 5'-UTR del rinovirus 14 humano con brazos de reconocimiento de sustrato de 9 nucleótidos de longitud, mientras que DH 5-7 representa la enzima de ADN correspondiente con brazos de reconocimiento de sustrato de 7 nucleótidos de longitud. Un diseño óptimo de los brazos de reconocimiento de sustrato (véase OMe7-4 y OMe7-5) permite aumentar más de 20 veces la actividad de la enzima de ADN bajo condiciones de MTO, que son decisivas por ejemplo para el uso *in vivo*. La enzima, en la que los 6 nucleótidos de la secuencia núcleo arriba mencionados están sustituidos conjuntamente por los ribonucleótidos de 2'-O-metilo correspondientes, sigue siendo esencialmente igual de activa que la enzima de ADN no modificada (véase CM6 y DH 5-9). La enzima de ADN en la que están modificados 12 nucleótidos de la secuencia de núcleo disocia eficazmente la 5'-UTR completa bajo condiciones de STO. Sin embargo, bajo condiciones de MTO, es inactiva frente a la diana completa (larga) (véase CM12). Si los nucleótidos sustituidos conjuntamente en CM12 se modifican individualmente en cada caso, los constructos correspondientes disocian una sección corta de 19 nucleótidos del ARN diana (5'-UTR del rinovirus 14 humano), que es complementaria a los brazos de reconocimiento de sustrato (no mostrado). Las barras muestran en cada caso el valor medio de tres experimentos independientes.

Figura 5: muestra en un diagrama cómo la velocidad inicial de la disociación de sustrato (v_{inic}) depende del punto de fusión de la hélice formada en una enzima de ADN entre las secciones I o III (brazos de reconocimiento de sustrato) con la secuencia diana en el caso de la enzima de ADN examinada de acuerdo con la Figura 4. En el gráfico se constata una velocidad inicial óptima con un punto de fusión algo por encima de la temperatura de reacción (37°C). En el presente caso resulta una temperatura de fusión óptima de 39°C.

Figura 6: se muestran en la Figura 6A los resultados de un experimento basado en un exceso céntuplo del ARN diana (*target* ADN) corto con una longitud de 19 nucleótidos. Para ello, dicho exceso se incubó con enzimas de ADN a 37°C durante 20 minutos. Se puede ver el sustrato no disociado (banda superior) y el producto de disociación 5' (banda inferior). En las pistas individuales se pueden ver las siguientes representaciones: pista 1: control sin enzima; pista 2: DH5 no modificada; pistas 3 a 17 (designadas como 1 a 15 en la representación): enzimas de ADN con ARN de 2'-O-metilo en cada caso en una de las posiciones 1 a 15 (en el orden numérico correspondiente). La figura 6B muestra una representación gráfica de las actividades de disociación relativas de enzimas de ADN contra la 5'-UTR del rinovirus 14 humano, en las que en cada caso un nucleótido de la secuencia de núcleo (posiciones 1 a 15 correspondientes a las muestras M1 a M15) ha sido modificado individualmente por modificaciones de 2'-O-metilo. La actividad correspondiente está normalizada con respecto a la enzima de ADN no modificada correspondiente con brazos de reconocimiento de 9 nucleótidos de longitud. Los nucleótidos 2, 7, 8, 11, 14 y 15 se pueden modificar sin pérdida de actividad o con un aumento de actividad. Las barras muestran en cada caso el valor medio de tres experimentos independientes con la desviación estándar indicada, tanto para las moléculas diana cortas (barras grises) como para las moléculas diana largas (barras negras). La altura de las barras indica el porcentaje de la disociación de ARN diana mediante las enzimas de ADN.

Figura 7: muestra la estabilidad de las enzimas de ADN modificadas en un medio de cultivo celular. Para ello, las enzimas de ADN se incubaron con una concentración final de 1 μM en DMEM con suero bovino fetal al 10%. Se tomaron muestras alícuotas en momentos determinados y la cantidad restante de oligonucleótidos de longitud completa se determinó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida. Se indican los promedios de vida media y las vidas medias ("half life"), normalizadas con respecto a la enzima de ADN no modificada de tres experimentos. En la Tabla 2 se indican los significados de las abreviaturas. Las modificaciones de los brazos de unión con los nucleótidos de LNA y fosforotioatos aumentaron la vida media de 2 horas a aproximadamente más de 20 horas. Una timidina invertida en el extremo 3' multiplicó la estabilidad por 10. Las modificaciones con 2'-O-metilo, que están situadas exclusivamente en los brazos de unión, resultaron ser claramente inferiores a otras modificaciones (vidas medias de aproximadamente 6,5 horas). La enzima de ADN DH5 E de nuevo diseño (con nucleótidos de 2'-O-metilo en los dos brazos de unión y el centro catalítico) demostró ser sumamente resistente a la degradación. La vida media aumentó a 25 horas.

Figura 8: muestra la estabilidad de las enzimas de ADN en comparación con la S1-endonucleasa. Las enzimas de ADN se incubaron a una concentración 2 μM con 0,4 U de S1 endonucleasa por 100 pmol de enzima de ADN. Se tomaron partes alícuotas en los momentos correspondientes. Los oligonucleótidos de longitud completa y los oligonucleótidos descompuestos se separaron en un gel de poliacrilamida desnaturizador al 20%. Se indican las vidas medias y la estabilidad relativa, normalizadas con respecto a la enzima de ADN no modificada. Como se puede observar en la figura 8, la enzima de ADN no modificada y las enzimas de ADN con "end-blocks" (bloques terminales) de timidina invertida y ARN de 2'-O-metilo se descomponen prácticamente por completo después de 30 minutos, con una vida media de aproximadamente 8 minutos. Los oligonucleótidos que contienen monómeros de LNA sólo se tiñen ligeramente con bromuro de etidio. Se puede observar que la enzima de ADN que había sido estabilizada mediante la introducción de LNA en los brazos de reconocimiento de sustrato era más estable frente a la S1-endonucleasa que la enzima de ADN no modificada. La DH5-Thio mostraba una curva de degradación de dos fases, que ha de atribuirse a la naturaleza quiral de los nucleótidos modificados. La endonucleasa descompone aproximadamente un 50% de la cantidad inicial, con una vida media de aproximadamente 13 minutos. La otra mitad está sujeta a

una constante de degradación mucho más lenta. La enzima de ADN optimizada con monómeros de 2'-O-metilo en el núcleo catalítico y en los brazos de reconocimiento de sustrato tiene la vida media más larga de todas las enzimas modificadas examinadas. Su estabilidad aumenta en más de dos veces con respecto a la enzima de ADN no modificada.

Figura 9: muestra las modificaciones según la invención de las enzimas de ADN optimizadas. La representación izquierda de la Figura 9 muestra enzimas de ADN contra la 5'-NTR (región no traducida) de HRV14 (DH5) y contra el ARNm de VR1 (DV15) en la parte derecha y sus ARN de sustrato correspondientes. Se indica la posición de los ARN diana que se unen a través de la enzima de ADN, y además están marcados los nucleótidos en los que se introducen monómeros de ARN de 2'-O-metilo en las enzimas de ADN.

Los siguientes ejemplos de realización describen más detalladamente la invención sin limitar la misma.

Ejemplo 1

Enzimas de ADN

Se examinaron enzimas de ADN con las siguientes secuencias:

1. Enzimas de ADN contra VR1

DV15-9: ATGTCGTGGGGCTAGCTACAACGAGATTAGG

DV15-7: GTCGTGGGGCTAGCTACAACGAGATTAGG

(Brazos de reconocimiento de sustrato subrayados)

Los constructos DV15 están dirigidas contra el 15 GUC del ARNm del VR1 humano.

2. Enzimas de ADN contra el rinovirus 14 humano

DH5-9: CCGGGGAAGGCTAGCTACAACGAAGAAGTGCT

DH5-8: CGGGGAAGGCTAGCTACAACGAAGAAGTGC

DH5-7: GGGGAAAGGCTAGCTACAACGAAGAAGTG

(Brazos de reconocimiento de sustrato subrayados)

Los constructos DH5 están dirigidas contra la 5'-UTR del rinovirus 14 humano, una secuencia de consenso que entre numerosos picornavirus es homologa con un grupo I IHRES.

Sustratos

1. ARNm de VR1

El ARNm de VR1 se preparó mediante transcripción *in vitro*. En primer lugar se clonó el ADNc del VR1 en el vector pcADN3.1 (+) (Invitrogen). A continuación se llevó a cabo la transcripción *in vitro* con RiboMAX Large Scale ARN Production System - T7 (Promega) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

2. 5'-UTR del rinovirus 14 humano

El ADN correspondiente a 5'-UTR del rinovirus 14 humano se obtuvo en el vector pCR2.1 (Stratagene) del Prof. Zeichhardt (Clínica Universitaria Benjamín Franklin de la Universidad Libre de Berlín). Después de una linearización con *Bam*HI, para obtener el ARN diana se llevó a cabo una transcripción *in vitro* como en el caso del ARNm de VR1.

Medición de la actividad de las enzimas de ADN

Las actividades enzimáticas se midieron en 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, y 10 mM MgCl₂ a 37°C. En el caso de las cinéticas “single turnover” (STO), las enzimas de ADN se utilizaron en un exceso décuplo (100 nM sustrato de ARN; 1 µM enzima de ADN) con respecto al sustrato. En los experimentos “multiple turnover” (MTO), el sustrato de ARN se utilizó en un exceso décuplo (100 nM sustrato de ARN; 10 nM enzima de ADN). En cada caso se realizaron determinaciones triples.

Influencia de las modificaciones de los brazos de reconocimiento de sustrato en la actividad de las enzimas de ADN

Las actividades de las enzimas de ADN DH-5 y DV-15 no modificadas con brazos de reconocimiento de sustrato de 9 nucleótidos (DH5-9, DV15-9) o 7 nucleótidos (DH5-7) se compararon con las siguientes enzimas de ADN con la misma secuencia de bases y modificadas químicamente en los brazos de reconocimiento de sustrato bajo condiciones STO y MTO (en las especies modificadas con 2'-O-metil-ribosa y LNA, los nucleótidos modificados se encontraban en cada caso en el extremo 5' del primer brazo de reconocimiento de sustrato (sección I) y en el extremo 3' del segundo brazo de reconocimiento de sustrato (sección III)):

TABLA 1

Enzimas de ADN con modificaciones de nucleótido específicas en los brazos de reconocimiento de sustrato

Denominación	Longitud del brazo	Modificación
OMe9-4	9	2'-O-metil-ribosa, 4 nucleótidos
OMe8-4	8	2'-O-metil-ribosa, 4 nucleótidos
OMe7-3	7	2'-O-metil-ribosa, 3 nucleótidos
OMe7-4	7	2'-O-metil-ribosa, 4 nucleótidos
OMe7-5	7	2'-O-metil-ribosa, 5 nucleótidos
OMe7-6	7	2'-O-metil-ribosa, 6 nucleótidos
OMe7-7	7	2'-O-metil-ribosa, 7 nucleótidos
OMe6-5	6	2'-O-metil-ribosa, 5 nucleótidos
DH5-iT	9	Timidina invertida, 1 nucleótido
DH5-Thio	9	Fosforotioato, 9 nucleótidos
LH5-9/4	9	LNA-ribosa, 4 nucleótidos
LH5-7/3	7	LNA-ribosa, 4 nucleótidos
LH5-7/4	7	LNA-ribosa, 4 nucleótidos

Los resultados de los experimentos comparativos con los constructos contra el rinovirus 14 humano (es decir, constructos DH5) están representados en la Figura 4, habiéndose tomado como valor 1 la actividad de la enzima de ADN no modificada con brazos de reconocimiento de sustrato con una longitud de 9 nucleótidos (DH5-9). Las actividades bajo condiciones MTO, decisivas principalmente para aplicaciones *in vivo*, muestran que las enzimas de ADN modificadas en los brazos de reconocimiento de sustrato no presentan ninguna pérdida esencial de actividad en comparación con los constructos comparativos no modificados (DH5-9 y DH5-7). También se comprueba que los constructos modificados con 2'-O-metil-ribosa y LNA, en particular aquellos en los que no todos los nucleótidos están modificados o donde se lleva a cabo una adaptación de la longitud de los brazos de reconocimiento de sustrato, muestran una actividad multiplicada en parte con respecto al constructo comparativo no modificado. En los constructos modificados con 2'-O-metil-ribosa (3, 4 ó 5 nucleótidos modificados, brazos de reconocimiento de sustrato con 7 u 8 nucleótidos), bajo condiciones de MTO se obtienen actividades entre más de 10 y más de 20 veces superiores a las de las enzimas de ADN no modificadas.

ES 2 339 654 T3

En el caso de la enzima de ADN contra el VR1 (DV15), para el constructo con 5 ribonucleótidos de 2'-O-metilo en los extremos de los brazos de reconocimiento de sustrato con una longitud de 7 nucleótidos se obtuvo el siguiente valor de la velocidad inicial bajo condiciones de MTO en comparación con el constructo no modificado:

DV15 (no modif.):	$0,5 \pm 0,1$ nM/min
DV15-7/5:	$1,7 \pm 0,2$ nM/min

Por consiguiente, el constructo modificado contra el VR1 es más de tres veces más activo que la enzima de ADN no modificada correspondiente.

Ejemplo 2

Dependencia de la velocidad de reacción del punto de fusión entre la enzima de ADN y el sustrato

Las modificaciones según la invención con ribonucleótidos de 2'-O-metilo y LNA aumentan la afinidad por el sustrato (es decir, aumenta el punto de fusión de la hélice formada entre la sección I o III con la secuencia diana). Sin embargo, para una actividad óptima bajo condiciones MTO, es necesaria una liberación eficiente del producto, por lo que la afinidad por el sustrato no debería ser muy alta. Por ello, en las enzimas de ADN modificadas según la invención de acuerdo con la anterior Tabla 1, la velocidad inicial bajo condiciones MTO (v_{inic}) se representa en función de la temperatura de fusión con el sustrato. De este modo se observa una correlación entre la temperatura de fusión y la velocidad de reacción, que en una primera aproximación se puede equiparar con una distribución de Gauss con un valor óptimo a aproximadamente 39°C (Figura 5).

Ejemplo 3

Influencia de las modificaciones de la secuencia de núcleo en la actividad de las enzimas de ADN

Los 15 nucleótidos de la secuencia de núcleo de DH5 se sustituyeron individualmente por los ribonucleótidos de 2'-O-metilo correspondientes y se midió la velocidad de reacción bajo condiciones MTO, tal como se indica en el Ejemplo 1. Se comprobó que los nucleótidos 2, 7, 8, 9, 11, 14 y 15 podían ser sustituidos por nucleótidos modificados sin pérdida de actividad (Figura 6). Incluso se produjo un aumento de actividad de al menos un 20%.

También se sustituyeron conjuntamente los 6 nucleótidos de DH5 por nucleótidos modificados con 2'-O-metil-ribosa (constructo CM6). La actividad se mantuvo esencialmente igual que la del constructo no modificado (Figura 4; véase CM6 con DH5-9).

En el caso de la enzima de ADN contra el VR1 se pudieron modificar conjuntamente los nucleótidos arriba mencionados de la secuencia de núcleo, y la actividad no sólo se mantuvo en comparación con el constructo no modificado, sino que incluso se observó un aumento de dicha actividad:

DV15 (no modif.):	$0,5 \pm 0,1$ nM/min
DV15-CM6:	$0,8 \pm 0,2$ nM/min

Ejemplo 4

Influencia de la combinación de modificaciones de la secuencia de núcleo y de los brazos de reconocimiento de sustrato en la actividad de las enzimas de ADN

También se examinó la velocidad de reacción inicial bajo condiciones MTO en la enzima de ADN contra el rinovirus 14 humano con brazos de reconocimiento de sustrato con una longitud de 7 nucleótidos, en la que se sustituyeron los nucleótidos 2, 7, 8, 11, 14 y 15 de la secuencia núcleo y en cada caso 5 nucleótidos del extremo de los brazos de reconocimiento de sustrato por los ribonucleótidos de 2'-O-metilo correspondientes.

El resultado fue una actividad del constructo modificada, es decir, completamente estabilizada, casi diez veces mayor que la actividad del constructo no modificado:

DV5-9 (no modif.):	$0,21 \pm 0,03$ nM/min
DV5-9 (compl. estable):	$2,0 \pm 0,1$ nM/min

Ejemplo 5

Análisis cinético con ARN diana largo (“long target ADN”)

Los experimentos cinéticos con “long target ADN” se llevaron a cabo en 50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂ y 1 U/μl ARNsin para evitar una degradación de ARN no específica. Las enzimas de ADN se desnaturalizaron durante 2 minutos a 65°C y después se enfriaron a 37°C. Las reacciones se iniciaron mediante la adición de la enzima de ADN a 100 mM de una solución “long target”. La concentración enzimática para los experimentos “turn over” simple y múltiple era de 1 μM y 10 nM. Se tomaron muestras alícuotas a intervalos definidos durante el primer 10% de la reacción en el caso de las condiciones “turn over” múltiple y durante un período prolongado en los análisis “turn over” simple. La reacción se interrumpió mediante la adición de 83 mM de EDTA y enfriamiento con hielo. Las reacciones de disociación se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa y marcado con bromuro de etidio. Las intensidades de banda se cuantificaron con ayuda del Quantity One Software (Bio-Rad, Munich, Alemania). Los datos se analizaron adicionalmente mediante “fitting” (adaptación) (bien linealmente para obtener una velocidad inicial v_{mic} en los experimentos de exceso de sustrato, bien con una función exponencial simple para obtener la velocidad de disociación observada en los experimentos de exceso de enzima y utilización de Origin (Microcal Software, Northampton, MA). Los valores son valores medios $\pm$ desviación estándar de al menos 3 experimentos independientes.

Ensayo de estabilidad

Se evaluó la resistencia frente a la descomposición nucleolítica de diferentes enzimas de ADN en el medio de cultivo celular. La enzima de ADN (1 μM) se incubó a 37°C en DMEM (Cytogen, Sinn, Alemania), que contenía un 10% de FCS (PAA Laboratorien, Linz, Austria). Las muestras se tomaron en momentos definidos entre 0 y 72 horas y las reacciones que continuaban se interrumpieron mediante la adición de una cantidad igual de urea 9M en TBE y enfriamiento subsiguiente en nitrógeno líquido. Los oligonucleótidos se extrajeron con fenol y se precipitaron a -20°C durante la noche mediante adición de acetato de sodio, pH 5,2, con lo que se obtuvo una concentración final 0,3M y se añadieron 2,5 vol. de etanol. El precipitado se lavó con etanol al 70% y se resuspendió en una cantidad adecuada de agua. Después de 5 minutos de desnaturalización a 85°C, los productos de descomposición se separaron en un gel de poliacrilamida desnaturalizador al 20%. También se realizaron otros análisis utilizando el Quantity One Software (Bio-Rad, Munich, Alemania). Las vidas medias de la enzima de ADN se obtuvieron mediante “fitting” del oligonucleótido de longitud completa en diferentes momentos a una función exponencial de primer orden utilizando Origin (Microcal Software, Northampton, MA).

Para medir la estabilidad de la enzima de ADN frente a la descomposición nucleolítica se incubaron 2 μM de oligonucleótidos con 0,4 U de S1 endonucleasa (Promega, Madison, WI) por 100 pmol de enzima de ADN en el tampón del fabricante (50 mM de acetato de sodio, pH 4,5, 280 nM NaCl, 4,5 mM ZnSO₄). Se tomaron muestras alícuotas en momentos definidos a intervalos entre 0 y 180 minutos. Las reacciones se interrumpieron mediante calentamiento a 98°C durante 3 minutos y enfriamiento subsiguiente en nitrógeno líquido. Los oligonucleótidos se precipitaron con etanol y su procesamiento continuó tal como se describe más arriba en relación con el ensayo de estabilidad en el medio de cultivo celular. Los valores son valores medios $\pm$ desviación estándar de al menos 3 experimentos independientes.

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 339 654 T3

TABLA 2

Enzima de ADN	Longitud de brazos	Modificación	T_M (°C)	k_{obs} (min^{-1})	V_{inic} ($\text{nM} \cdot \text{min}^{-1}$)
DH5-9/0	9	Ninguna	32	$0,057 \pm 0,005$	$0,21 \pm 0,03$
DH5-7/0	7	Ninguna	n.d. (<25)	$0,033 \pm 0,002$	n.d. ($<0,05$)
DH5-iT	9	T invertida en extremo 3'	33	$0,052 \pm 0,005$	$0,19 \pm 0,01$
DH5-Thio	9	Brazos de unión todo fosforotioato	27	$0,009 \pm 0,001$	n.d. ($<0,05$)
LH5-9/4	9	4 bloques terminales LNA	63	$0,24 \pm 0,02$	$0,08 \pm 0,02$
LH5-7/3	7	3 bloques terminales LNA	48	$0,45 \pm 0,01$	$1,2 \pm 0,1$
LH5-7/4	7	4 bloques terminales LNA	61	$0,44 \pm 0,05$	$0,45 \pm 0,09$
DH5- OMe9/4	9	4 bloques terminales OMe	47	$0,11 \pm 0,01$	$1,2 \pm 0,1$
DH5- OMe8/4	8	4 bloques terminales OMe	44	$0,29 \pm 0,01$	$2,8 \pm 0,5$
DH5- OMe7/3	7	3 bloques terminales OMe	32	$0,12 \pm 0,03$	$3,8 \pm 0,3$
DH5- OMe7/4	7	4 bloques terminales OMe	37	$0,31 \pm 0,01$	$4,7 \pm 0,4$
DH5- OMe7/5	7	5 bloques terminales OMe	39	$0,5 \pm 0,1$	$4,7 \pm 0,9$
DH5- OMe7/6	7	6 bloques terminales OMe	44	$0,23 \pm 0,06$	$1,9 \pm 0,5$
DH5- OMe7/7	7	7 bloques terminales OMe	47	$0,027 \pm 0,006$	$0,21 \pm 0,02$
DH5- OMe6/5	6	5 bloques terminales OMe	26	$0,17 \pm 0,01$	$1,1 \pm 0,2$
DH5-CM6	9	6 OMe en el centro catalítico	31	$0,06 \pm 0,01$	$0,09 \pm 0,01$

<i>Enzima de ADN</i>	<i>Longitud de brazos</i>	<i>Modificación</i>	T_M (°C)	k_{obs} (min^{-1})	v_{inic} ($\text{nM} \cdot \text{min}^{-1}$)
DH5 E	7	5 bloques terminales OMe; 6 OMe en el centro catalítico	39	$0,57 \pm 0,07$	$2,0 \pm 0,2$
DV15 9/10	9	Ninguna	37	$0,9 \pm 0,1$	$0,5 \pm 0,1$
DV15-OMe7/5	7	5 bloques terminales OMe	40	$0,83 \pm 0,07$	$1,7 \pm 0,2$
DV15-CM6	9	6 OMe en el centro catalítico	36	$0,43 \pm 0,03$	$0,8 \pm 0,2$
DV15 E	7	5 bloques terminales OMe; 6 OMe en el centro catalítico	37	$0,05 \pm 0,01$	n.d. (<0,05)
DV15 E4	7	4 bloques terminales OMe; 6 OMe en el centro catalítico	36	$0,31 \pm 0,08$	$1,3 \pm 0,2$

La Tabla 2 muestra las enzimas de ADN analizadas con sus respectivas longitudes de brazo y las modificaciones realizadas correspondientes. La Tabla 2 también incluye el punto de fusión (T_m (°C)) y las velocidades de disociación observadas (min^{-1}) (k_{obs}) en experimentos “*turn over*” simple y las velocidades iniciales (v_{inic}) en experimentos “*turn over*” múltiple (en cada caso con ARN “*long target*”). En las denominaciones de las enzimas de ADN, delante de la barra inclinada se indica en cada caso la cantidad de nucleótidos de cada brazo de unión. La indicación detrás de la barra inclinada se refiere a la cantidad de nucleótidos modificados en cada brazo de unión. La abreviatura OMe representa la modificación con 2'-O-metilo. La abreviatura iT representa timidina invertida en 3'. Thio significa que los brazos de unión contienen todos los fosforotioatos. L representa la modificación con LNA. T_m indica las temperaturas de fusión de los dúplex de molécula diana/enzima.

TABLA 3

	v_{inic}	$t_{1/2}$ <i>medio</i>	$t_{1/2}$ <i>S1-nucl.</i>	<i>Índice de rendimiento</i>
DH5-9/0	1	1	1	1
DH5-Thio	< 0,23	11,5	1,6	< 4
DH5-iT	0,9	11,5	1	10
DH5-OMe7/5	22,4	3,5	1	78
LH5-7/3	5,7	9,5	1,5	81
DH5 E	9,7	12,5	2,1	255

La Tabla 3 incluye un resumen de una comparación de los resultados de diferentes enzimas de ADN modificadas. Se indica la velocidad inicial bajo las diferentes condiciones “*turn over*”, es decir, en el medio de cultivo celular, y la estabilidad frente a endonucleasa S1. Todos los valores están normalizados con respecto a la enzima de ADN no modificada. La última columna muestra un índice del resultado total de tres valores de las enzimas de ADN modificadas. En cuanto a las abreviaturas utilizadas, véanse más arriba las aclaraciones correspondientes en relación con la Tabla 2.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Enzima de ADN de tipo 10-23 que incluye, desde el extremo 5' hacia el extremo 3', un primer brazo de reconocimiento de sustrato ("sección I"), una secuencia de núcleo catalítica ("sección II") y un segundo brazo de reconocimiento de sustrato ("sección III"), estando modificados químicamente en la sección II únicamente uno o más de los nucleótidos 2, 7, 8, 11, 14 y 15, y seleccionándose el o los nucleótidos modificados de entre el grupo consistente en nucleótidos de fosforotioato, timidina invertida, ribonucleótidos de 2'-O-metilo y ribonucleótidos de LNA.
- 10 2. Enzima de ADN según la reivindicación 1, **caracterizada** porque todos los nucleótidos 2, 7, 8, 11, 14 y 15 de la sección II están modificados.
3. Enzima de ADN según la reivindicación 1 ó 2, **caracterizada** porque uno o más de los nucleótidos de la sección I y/o la sección III están modificados.
- 15 4. Enzima de ADN según la reivindicación 3, **caracterizada** porque 3 a 5 nucleótidos de la sección I y/o de la sección III están modificados.
- 20 5. Enzima de ADN según la reivindicación 4, **caracterizada** porque los nucleótidos modificados se encuentran en el extremo 5' de la sección I y/o en el extremo 3' de la sección III.
6. Enzima de ADN según la reivindicación 4 ó 5, **caracterizada** porque los nucleótidos modificados de la sección I y/o de la sección III son ribonucleótidos de 2'-O-metilo o de LNA.
- 25 7. Enzima de ADN según una de las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizada** porque la sección I y/o la sección III no incluyen más de 8 nucleótidos.
8. Enzima de ADN según la reivindicación 7, **caracterizada** porque la sección I y/o la sección III incluyen 7 nucleótidos.
- 30 9. Enzima de ADN según la reivindicación 3, **caracterizada** porque todos los nucleótidos de la sección I y/o de la sección III son nucleótidos de fosforotioato o ribonucleótidos de 2'-O-metilo.
- 35 10. Enzima de ADN según una de las reivindicaciones 3 a 9, **caracterizada** porque la temperatura de fusión de las cadenas dobles formadas entre las secciones I y III y la molécula diana oscila entre aproximadamente 33 y aproximadamente 42°C.
- 40 11. Enzima de ADN según una de las reivindicaciones 1 a 10, **caracterizada** porque la sección II presenta la siguiente secuencia consenso desde el extremo 5' hacia el extremo 3':

GGMTMGH(N)DNNNMGD

siendo

- 45 M = A o C;
H = A, C o T;
D = G, A o T; y
50 N = cualquier base.

12. Enzima de ADN según una de las reivindicaciones 1 a 11, **caracterizada** porque está dirigida contra el ARNm del receptor vainilloide 1 (VR1).

- 55 13. Enzima de ADN según la reivindicación 12, **caracterizada** porque las secciones I y III presentan, desde el extremo 5' hacia el extremo 3', las siguientes secuencias o una secuencia diferente a éstas en un nucleótido, con la condición de que el nucleótido que difiere de las secuencias indicadas no se encuentre en una de las tres últimas posiciones de la sección I ni en una de las tres primeras posiciones de la sección III:

Sección I	Sección III
GTCATGA	CGTTAGG
TGTCATGA	CGTTAGGG
ATGTCATGA	GGTTAGGGG
GTCGTGG	GATTAGG

ES 2 339 654 T3

	TGTCGTGG	GATTAGG
	ATGTCGTGG	GATTAGG
5	TTGTTGA	GGTCTCA
	CTTGTTGA	GGTCTCAC
	TCTTGTTGA	GGTCTCACC
10	TTGTTGA	AGTCTCA
	CTTGTTGA	AGTCTCAN
15	TCTTGTTGA	AGTCTCANN
	GGCCTGA	CTCAGGG
	CGGCCTGA	CTCAGGGA
20	TCGGCCTGA	CTCAGGGAG
	TGCTTGA	CGCAGCG
	CTGCTTGA	CGCAGCGN
25	TCTGCTTGA	CGCAGCGNN
	GTGTGGA	TCCATAG
30	GGTGTGGA	TCCATAGG
	TGGTGTGGA	TCCATAGGC
	ACGTGGA	TCAGACG
35	GACGTGGA	TCAGACGN
	CGACGTGGA	TCAGACGNN
	GTGGGGA	TCAGACT
40	GGTGGGGA	TCAGACTC
	GGGTGGGGA	TCAGACTCC
45	GTGGGTC	GCAGCAG
	AGTGGGTC	GCAGCAG
	GAGTGGGTC	GCAGCAG
50	CGCTTGA	AAATCTG
	GCGCTTGA	AAATCTGT
	TGCGCTTGA	AAATCTGTC
55	CGCTTGA	GAATCTG
	GCGCTTGA	GAATCTGN
60	TGCGCTTGA	GAATCTGNN
	CTCCAGA	ATGTGGA

65

	GCTCCAGA	ATGTGGAA
	AGCTCCAGA	ATGTGGAAT
5	CTCCAGG	AGGTGGA
	GCTCCAGG	AGGTGGA
	AGCTCCAGG	AGGTGGA
10	GGTACGA	TCCTGGT
	GGGTACGA	TCCTGGTA
	CGGGTACGA	TCCTGGTAG
15	GGTGCGG	TCTTGGC
	GGGTGCGG	TCTTGGC
20	CGGGTGCGG	TCTTGGC

con N = cualquier base.

25 14. Célula huésped que contiene al menos una enzima de ADN según una de las reivindicaciones 1 a 13, **caracterizada** porque la célula huésped no es un gameto humano ni una célula madre embrionaria humana.

15. Célula huésped según la reivindicación 14, **caracterizada** porque consiste en una célula de mamífero.

30 16. Célula huésped según la reivindicación 15, **caracterizada** porque consiste en una célula humana.

17. Procedimiento *ex vivo* para la inhibición de la expresión de un gen, que incluye la introducción de al menos una enzima de ADN según una de las reivindicaciones 1 a 15 en una célula que expresa el gen.

35 18. Procedimiento *ex vivo* según la reivindicación 17, **caracterizado** porque el gen es el gen de VR1 y en la célula se introduce al menos una enzima de ADN según la reivindicación 12 ó 13.

40 19. Medicamento que contiene al menos una enzima de ADN según una de las reivindicaciones 1 a 13 y/o una célula huésped según una de las reivindicaciones 14 a 16, en caso dado en combinación con uno o más materiales soporte y/o vehículos farmacéuticamente compatibles.

20. Utilización de la enzima de ADN según la reivindicación 12 ó 13 o de la célula huésped según una de las reivindicaciones 14 a 16 para producir un medicamento para la prevención y/o el tratamiento del dolor, en particular del dolor crónico, alodinia táctil, dolor provocado térmicamente y/o dolor inflamatorio.

45 21. Utilización de la enzima de ADN según la reivindicación 12 ó 13 o de la célula huésped según una de las reivindicaciones 14 a 16 para producir un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de síntomas neurógenos de la vejiga, incontinencia urinaria, trastornos de sensibilidad asociados con el VR1, inflamaciones asociadas con el VR1 y tumores asociados con el VR1.

50

55

60

65

Fig. 1

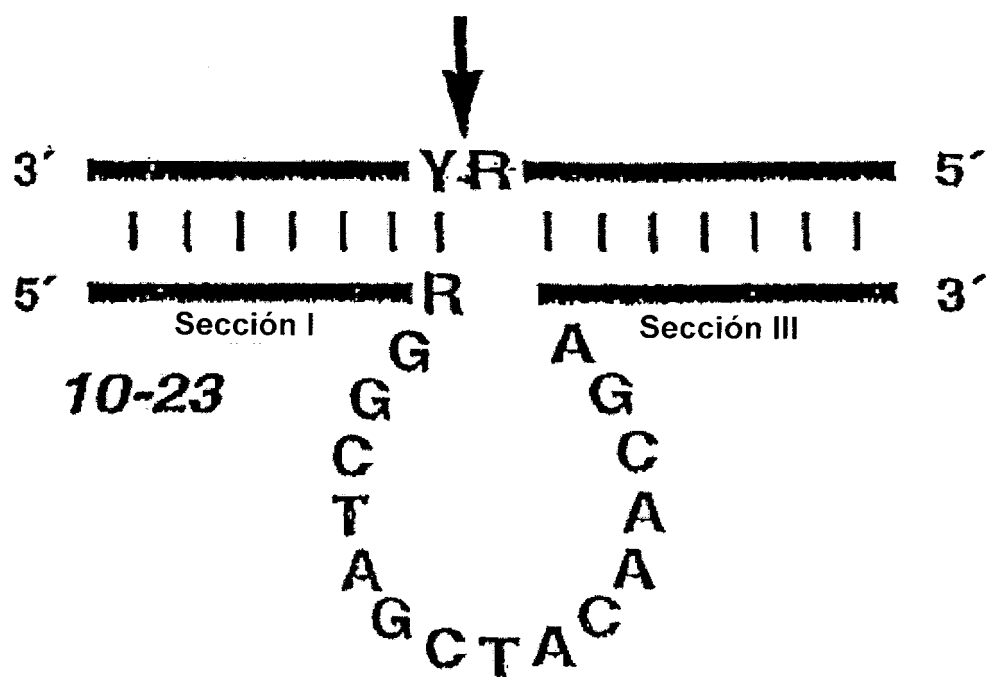


Fig. 2

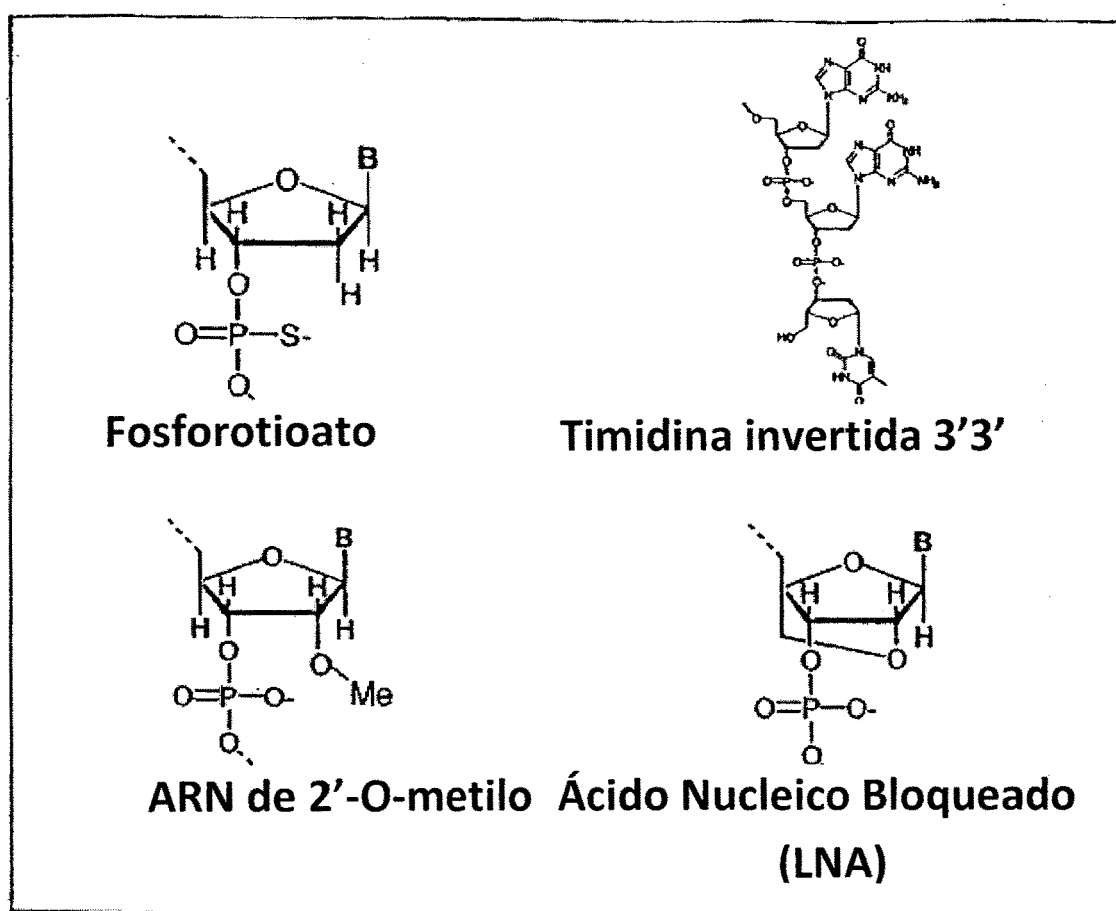


Fig. 3

B

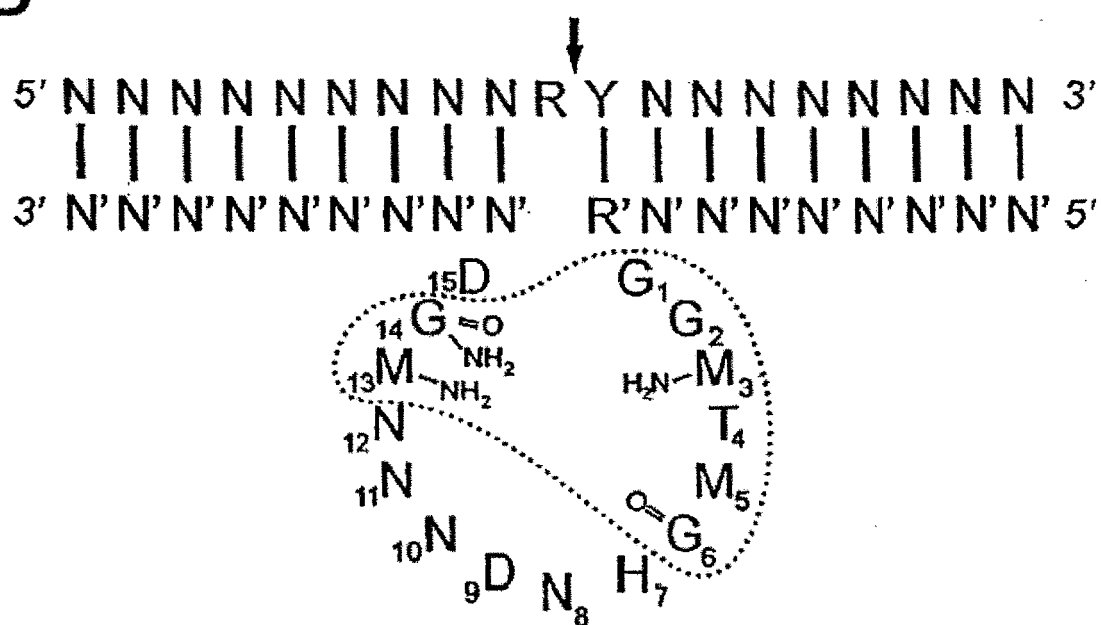


Fig. 4

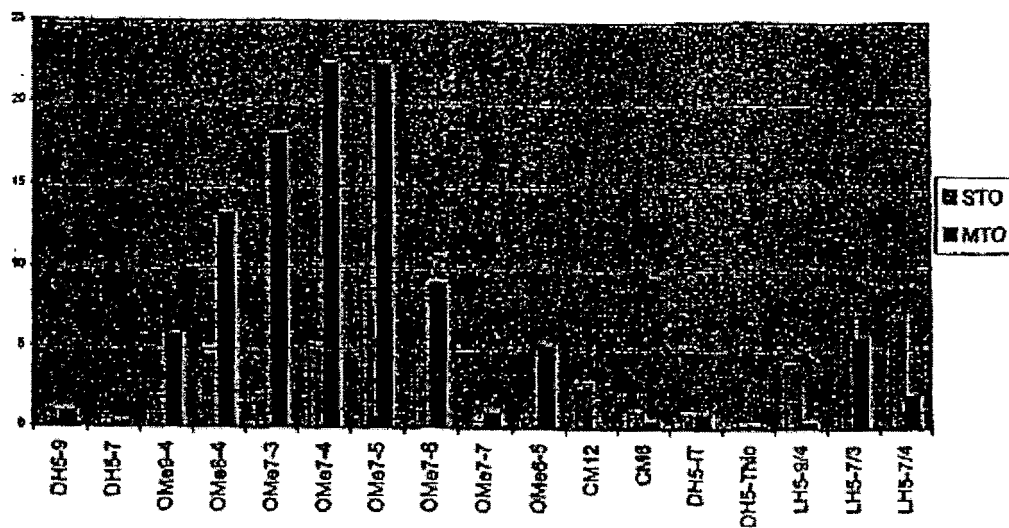
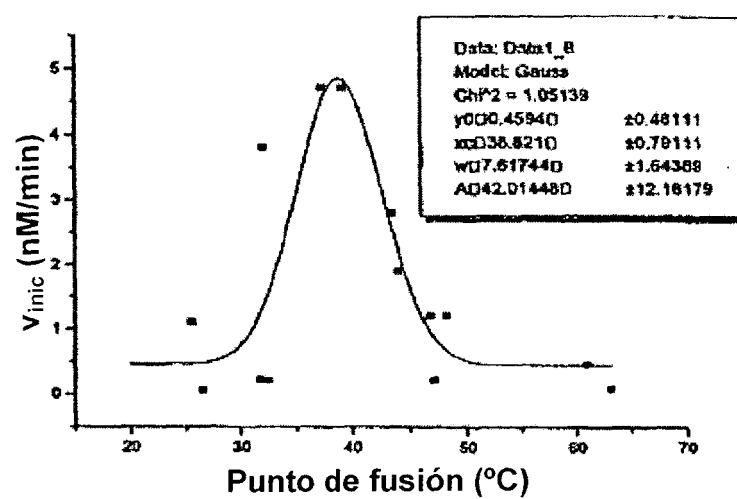


Fig. 5

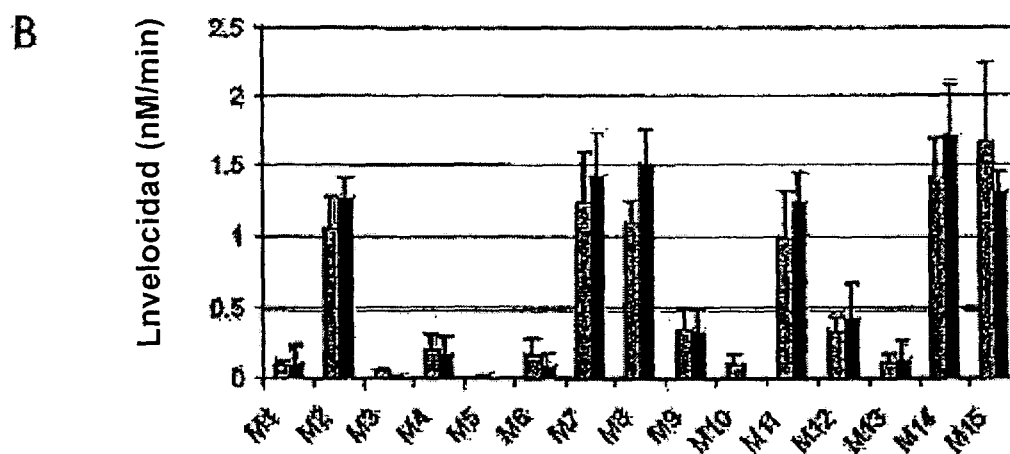


A

Fig. 6

OMe C U

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15



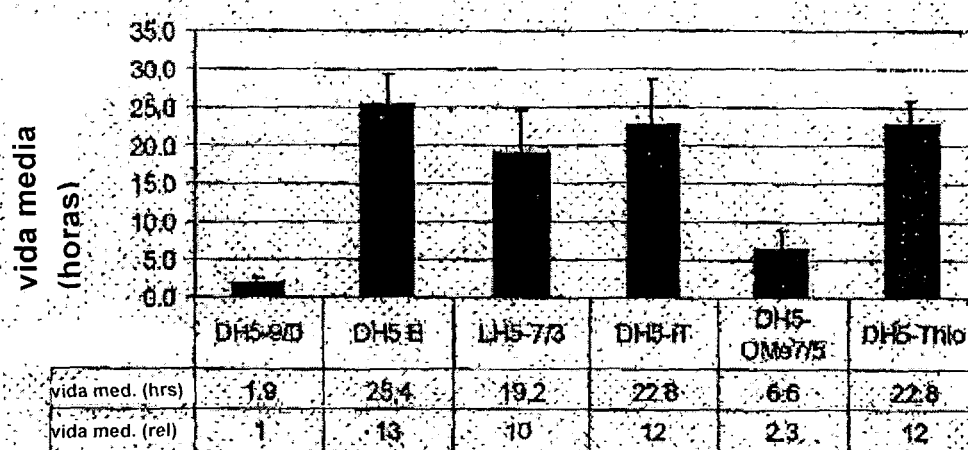


Figura 7

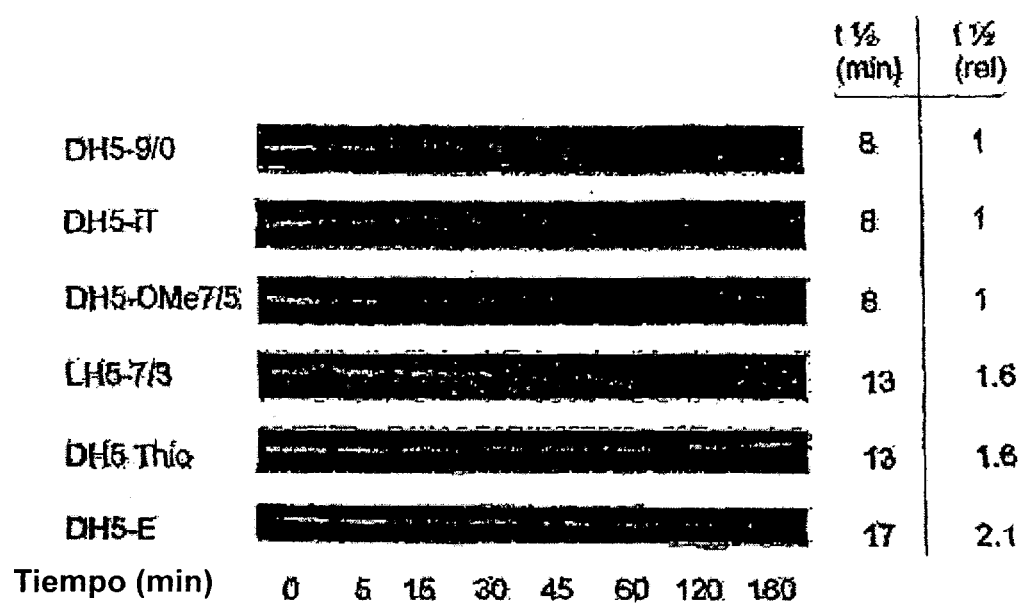


Fig. 8

Fig. 9

