



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 359 408**

51 Int. Cl.:
A61K 38/17 (2006.01) **A61K 39/395** (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01) **A61P 17/02** (2006.01)
A61P 17/06 (2006.01) **A61P 25/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04727963 .3**
96 Fecha de presentación : **16.04.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1613341**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **11.01.2006**

54 Título: **Uso de SLURP-1 para tratar enfermedades relacionadas con la disfunción de receptores de acetilcolina.**

30 Prioridad: **16.04.2003 US 463418 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
23.05.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
23.05.2011

73 Titular/es: **MERCK SERONO S.A.**
Centre Industriel
1267 Coinsins, Vaduz, CH

72 Inventor/es: **Chimienti, Fabrice;**
Hogg, Ronald;
Huber, Marcel;
Bertrand, Daniel y
Hohl, D.

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 359 408 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

Uso de SLURP-1 para tratar enfermedades relacionadas con la disfunción de receptores de acetilcolina

5 CAMPO DE LA INVENCION

Esta invención se refiere, de manera general, a composiciones para el uso en el tratamiento o prevención de trastornos neurológicos y patologías de la piel, así como para la modulación de la actividad de los receptores de acetilcolina.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La superfamilia Ly-6/uPAR de receptores y proteínas secretadas contiene un motivo de secuencia de consenso carboxi-terminal CCXXXXCN (SEQ ID NO:1) y una o varias repeticiones del dominio Ly-6/uPAR, lo cual es definido por un claro patrón de enlace por disulfuro entre ocho o diez residuos de cisteína (véase Ploug et al., J. Biol. Chem., 268, 17539-17546 (1993); Ploug y Ellis, FEBS Lett., 349, 163-168 (1994); Casey et al., Blood, 84, 1151-1156 (1994)).

15

20

25

30

La superfamilia se puede clasificar en dos subfamilias, en base a la presencia o ausencia de una secuencia señal de anclaje a GPI (véase Adermann et al., Protein Sci., 8, 810-819 (1999)). Las proteínas de receptor Ly-6/uPAR ancladas a GPI incluyen el gen E inducido por ácido retinoico (RIG-E, o Ly-6E humano), el antígeno E48 (Ly-6D humano); Ly-6H; el PSCA; CD59 o protectina; Lynx1 y uPAR (véase Shan et al., J. Immunol., 160, 197-208 (1998); Brakenhoff et al., J. Cell Biol., 129, 1677-1689 (1995); Horie et al., Genomics, 53, 365-368 (1998); Reiter et al., Proc. Natl Acad. Sci. USA, 95, 1735-1740 (1998); Tone et al., J. Mol. Biol., 227, 971-976 (1992)). Se sabe que el gen E48 se expresa en los queratinocitos humanos, pero no en los linfocitos, y modula la adhesión desmosómica célula-célula de los queratinocitos (Brakenhoff et al., J. Cell Biol., 129, 1677-1689 (1995); Schrijvers et al., Exp. Cell. Res., 196, 264-269 (1991)). El receptor del activador del plasminógeno de tipo uroquinasa (uPAR) interactúa en asociación dinámica con las integrinas e inicia los eventos de señalización que alteran la adhesión, migración, proliferación y diferenciación celular (véase Blasi y Carmeliet, Nat. Rev. Mol. Cell. Biol., 3, 932-943 (2002)). El uPAR es un miembro lejano de la familia Ly-6/uPAR y, al contrario que otros miembros, contiene tres copias contiguas del dominio Ly-6/uPAR. La escisión diferencial de estos dominios regula las múltiples funciones del uPAR (véase Palfree, Immunol. Today, 12, 170 (1991); Montuori, et al., J. Biol. Chem., 277, 46932-46939 (2002)).

35

40

La segunda subfamilia, que tiene un dominio Ly-6/uPAR pero no tiene secuencia señal de anclaje a GPI, incluye SLURP-1 y SLURP-2 (véase Adermann et al., Protein Sci., 8, 810-819 (1999); Tsuji et al., Genomics, 81, 26-33 (2003)). Las mutaciones en el gen que codifica la SLURP-1 han sido implicadas en el Mal de Meleda (MdM), ya que el gen MdM está situado en un racimo de genes Ly-6 en el cromosoma 8q24.3 (véase Fischer et al., Eur. J. Hum. Genet., 6, 542-547 (1998); Fischer et al., Hum. Mol. Genet., 10, 875-880 (2001); Eckl et al., Hum. Genet., 112, 50-56 (2003); Ward et al., J. Invest. Dermatol., 120, 96-98 (2003)).

COMPENDIO DE LA INVENCION

45

La presente invención proporciona composiciones para el uso en el tratamiento de un trastorno neurológico en un paciente administrando una cantidad eficaz de SLURP-1 o una proteína relacionada a un paciente que padece el trastorno neurológico.

50

La presente invención también proporciona composiciones para el uso en la prevención o el retraso del comienzo de un trastorno neurológico en un paciente administrando una cantidad eficaz de SLURP-1 o una proteína relacionada a un paciente en riesgo de desarrollar o padecer el trastorno neurológico.

55

También se proporcionan composiciones para el uso en la neuroprotección a un paciente administrando una cantidad eficaz de SLURP-1 o una proteína relacionada al paciente, donde la neuroprotección previene un trastorno neurológico causado por la disfunción de un receptor de acetilcolina.

60

La presente invención proporciona adicionalmente composiciones para el uso en el tratamiento de una patología de la piel causada por la disfunción de un receptor de acetilcolina expresado en la piel administrando una cantidad eficaz de SLURP-1 o una proteína relacionada a un paciente que padece la patología de la piel.

La presente invención también proporciona composiciones para el uso en la prevención o el retraso del comienzo de una patología de la piel causada por la disfunción de un receptor de acetilcolina expresado en la piel administrando una cantidad eficaz de SLURP-1 o una proteína relacionada a un paciente en riesgo de desarrollar o padecer la patología de la piel.

65

Se describen composiciones que incluyen una cantidad eficaz de SLURP-1, un mimético de la SLURP-1, o una combinación de los mismos y un vehículo, donde la composición modula la función de un receptor de acetilcolina nicotínico alfa 7 o de una proteína relacionada.

5 La invención describe métodos para modular la actividad de un receptor de acetilcolina poniendo en contacto el receptor de acetilcolina con una cantidad eficaz de SLURP-1, donde la cantidad eficaz de SLURP-1 es de aproximadamente 1,0 pM a aproximadamente 10 µM. En una realización preferida, la modulación del receptor de acetilcolina restablece la función apropiada del receptor de acetilcolina.

10 La invención describe métodos de cribado para un modulador de la actividad del receptor de acetilcolina a) exponiendo un primer receptor de acetilcolina a un compuesto candidato y midiendo la actividad del primer receptor de acetilcolina después de la exposición, b) exponiendo un segundo receptor de acetilcolina a una cantidad eficaz de SLURP-1 o un compuesto relacionado y midiendo la actividad del segundo receptor de acetilcolina después de la exposición, y c) comparando la actividad del primer receptor de acetilcolina después de la primera exposición con la actividad del segundo receptor de acetilcolina después de la exposición a la SLURP-1 o un compuesto relacionado. En tales métodos, si la actividad del primer receptor de acetilcolina es similar a la actividad del segundo receptor de acetilcolina, entonces el compuesto candidato es un modulador de la actividad del receptor de acetilcolina.

15 En las realizaciones preferidas de la invención, el trastorno neurológico que se trata y/o previene puede ser una patología causada por la disfunción de un receptor de acetilcolina. Por ejemplo, el trastorno neurológico puede incluir dolor, dolor neuropático, esquizofrenia, daños cognitivos, enfermedad de Alzheimer y enfermedad de Parkinson. Asimismo, la patología de la piel que se trata y/o previene puede incluir Mal de Meleda, cicatrización y psoriasis. En las realizaciones preferidas de la invención, el receptor de acetilcolina es un receptor de acetilcolina nicotínico. Específicamente, el receptor de acetilcolina nicotínico puede ser un receptor de acetilcolina nicotínico alfa 7 o una proteína relacionada con el receptor de acetilcolina nicotínico alfa 7.

20 En algunas realizaciones, la SLURP-1 es administrada al paciente en una forma madura. Como se emplea en la presente memoria, la forma madura de la SLURP-1 incluye los aminoácidos 23-103 de la SLURP-1.

25 La presente invención también proporciona composiciones para el uso en el tratamiento de un trastorno neurológico causado por la disfunción del receptor de acetilcolina nicotínico alfa 7 administrando una composición que contiene una cantidad eficaz de SLURP-1, o un mimético de la SLURP-1 o una combinación de los mismos y un vehículo a un paciente que padece el trastorno neurológico.

30 También se proporcionan métodos para prevenir o retrasar el comienzo de un trastorno neurológico causado por la disfunción del receptor de acetilcolina nicotínico alfa 7 administrando una composición de la presente invención a un paciente en riesgo de desarrollar o padecer el trastorno neurológico.

35 La presente invención proporciona además composiciones para el uso en el tratamiento de una patología de la piel causada por la disfunción de un receptor de acetilcolina nicotínico alfa 7 expresado en la piel administrando una composición que contiene una cantidad eficaz de SLURP-1, o un mimético de la SLURP-1 o una combinación de los mismos y un vehículo a un paciente que padece la patología de la piel.

40 Asimismo, la presente invención también proporciona composiciones para el uso en la prevención o el retraso del comienzo de una patología de la piel causada por la disfunción de un receptor de acetilcolina nicotínico alfa 7 expresado en la piel administrando una composición de la presente invención a un paciente en riesgo de desarrollar o padecer la patología de la piel.

45 La presente invención describe un anticuerpo con una alta afinidad de unión específica a la SLURP-1. Los anticuerpos de la invención pueden ser monoclonales, policlonales o humanizados.

50 En diversas realizaciones de la invención, una cantidad eficaz de SLURP-1 puede ser de aproximadamente 1,0 pM a aproximadamente 10 µM, o formar una disolución para entrar en contacto con el receptor de acetilcolina de aproximadamente 1,0 pM a aproximadamente 10 µM. La cantidad eficaz de SLURP-1 puede ser administrada por vía oral, intravenosa, intraperitoneal, intranasal o intramuscular. La administración de SLURP-1 también puede incluir la administración de un vector de expresión capaz de expresar la proteína SLURP-1 en el paciente. Preferiblemente, el paciente que recibe la SLURP-1 es un mamífero. Más preferiblemente, el paciente es un ser humano.

55 A menos que se definan de otra manera, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que el que entiende comúnmente un especialista habitual en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque se pueden usar métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente memoria en la práctica o ensayos de la presente invención, se describen más adelante métodos y materiales adecuados. Además, los materiales, métodos y ejemplos son ilustrativos solamente, y no pretenden ser limitantes.

60 Otros rasgos y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y reivindicaciones.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

- 5 La Figura 1A es una vista esquemática de un constructo de SLURP-1 recombinante etiquetado con etiqueta HA y etiqueta myc. Las Figuras 1B y 1C son fotografías correspondientes de inmunoblots que muestran que la secuencia señal de la SLURP-1 es escindida durante el procesamiento, y que muestran que la SLURP-1 no está glicosilada, respectivamente.
- Las Figuras 2A y 2B son fotografías de inmunoblots que muestran la purificación de la SLURP-1.
- 10 La Figura 3A es una representación esquemática y la Figura 3B es el modelo tridimensional correspondiente que muestra la homología estructural entre la SLURP-1, miembros de la familia Ly-6/uPAR y diversas toxinas de veneno de serpiente.
- La Figura 4 es una representación esquemática que muestra las comparaciones de homología entre miembros de la familia Ly-6/uPAR y diversas toxinas de veneno de serpiente.
- 15 La Figura 5A es un registro electrofisiológico y las Figuras 5B y 5C son gráficos de barras y de líneas correspondientes que muestran que la SLURP-1 modula la actividad de los receptores de acetilcolina.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

- 20 La presente invención está basada en parte en la capacidad de la SLURP-1 de modular la actividad de los receptores de acetilcolina. La SLURP-1 es una proteína de 9 kDa codificada por el gen ARS B. La secuencia de aminoácidos de la SLURP-1 tiene 103 residuos de aminoácidos:

MASRWAVQLLLVAAWSMGCGEALKCYTCKEPMTSASCRTITRCKPEDTACMTTLV
TVEAEYFPNQSPVVTRSCSSSCVATDPDSIGAAHLIFCCFRDLCNSEL (SEQ ID NO:2).

- 25 La presente invención proporciona composiciones para el uso en el tratamiento, prevención o retraso del comienzo de un trastorno neurológico o una patología de la piel, así como métodos para modular la actividad de un receptor de acetilcolina. Como se describe en la presente memoria en los Ejemplos 1 y 2 más adelante, la SLURP-1 contiene un péptido señal en los aminoácidos 1-22 y es secretada por escisión de la señal N-terminal en una forma madura, no glicosilada (aminoácidos 23-103 de la SEQ ID NO:2).
- 30 Se ha mostrado en la presente memoria que la SLURP-1 interactúa con los receptores de acetilcolina y modula su actividad. Por ejemplo, la SLURP-1 aumentó la amplitud de corrientes macroscópicas provocadas por acetilcolina de una manera dependiente de la concentración. Específicamente, la SLURP-1 (a una concentración de 200 pM) aumentó la amplitud de las corrientes macroscópicas provocadas por acetilcolina en un $421 \pm 130\%$ ($n=6$), y 20 nM de SLURP-1 aumentaron la amplitud en un $1214 \pm 550\%$ ($n=4$). Véase el Ejemplo 4, más adelante. Además, la SLURP-1 indujo un aumento tanto en la amplitud de la corriente como en la sensibilidad a la acetilcolina, así como un aumento en el coeficiente de Hill. Como la aplicación de SLURP-1 no provocó corrientes en ausencia de acetilcolina, la SLURP-1 no funciona como ligando o como neurotransmisor. Más bien, la SLURP-1 modula la función de los receptores de acetilcolina en presencia de su ligando natural, lo que demuestra que la SLURP-1 actúa como un efector alostérico positivo en los receptores de acetilcolina. Este descubrimiento es apoyado además por el aumento de la sensibilidad a la acetilcolina y el aumento de la cooperatividad aparente, que son distintivos de los efectores alostéricos (véase Changeux y Edelstein, *Curr. Opin. Neurobiol.*, 11, 369-377 (2001)).
- 40 La presente invención también incluye la modulación de la homeostasis epidérmica del calcio y la proliferación y diferenciación de queratinocitos. La SLURP-1 está estrechamente relacionada con la subfamilia de citotoxinas de serpientes y ranas de dominio único, es decir, la α -bungarotoxina (Bgtx) y la α -cobratoxina (Cbtx). Véase el Ejemplo 3, más adelante. Este alto grado de homología estructural entre la SLURP-1 y estas neurotoxinas de serpiente indica que la SLURP-1 interactúa probablemente con los canales iónicos, los subtipos muscular y neuronal del receptor de acetilcolina nicotínico, y receptores tanto muscarínicos como nicotínicos que se expresan en los queratinocitos (véase Grando y Horton, *Curr. Opin. Dermatol.*, 4, 262-268 (1997); Grando, *J. Invest. Dermatol. Symp. Proc.*, 2, 41-48 (1997)). Los receptores de acetilcolina nicotínicos epidérmicos están implicados en la regulación de la adhesión celular, motilidad de los queratinocitos epidérmicos y cicatrización (véase Grando et al., *J. Invest. Dermatol.*, 105, 774-781 (1995); Jacobi et al., *Am. J. Pathol.*, 161, 97-104 (2002)).
- 45 Estas interacciones de la SLURP-1 son comparables a la acción de la Lynx1. Se ha demostrado que la Lynx1 interactúa con los receptores de acetilcolina nicotínicos neuronales en el sistema nervioso central, donde modula la permeabilidad celular al calcio (véase Miwa et al., *Neuron*, 23, 105-114 (1999)). El calcio tiene un papel establecido en la homeostasis de la piel de los mamíferos, y modula la proliferación y diferenciación de los queratinocitos (véase Menon et al., *J. Invest. Dermatol.*, 84, 508-512 (1985); Elias et al., *J. Invest. Dermatol.*, 119, 1128-1136 (2002)). Además, la asociación entre el trastorno queratósico de la piel palmoplantar, Mal de Meleda, y las mutaciones en la SLURP-1 indican que la alteración o mutación de la proteína SLURP-1 secretada también puede interrumpir la homeostasis de la piel. Además, la señalización de acetilcolina mediante canales de receptores de acetilcolina nicotínicos alfa ($\alpha 7$) parece ser funcional en los queratinocitos y esencial para la homeostasis epidérmica.
- 60

La presente invención también describe la modulación de respuestas inflamatorias (p.ej., inflamación cutánea). Por ejemplo, el TNF- α es una citoquina proinflamatoria pleiotrópica que provoca un gran número de efectos biológicos, que incluyen respuestas inflamatorias e inmunorregulatorias (véase Kondo y Sauder, Eur. J. Immunol., 27, 1713-1718 (1997)). Se sabe que el TNF- α es liberado de los queratinocitos después de la estimulación con lipopolisacárido (LPS), luz ultravioleta (UV) o cicatrización, y participa en la inflamación cutánea (véase Kock et al., J. Exp. Med., 172, 1609-1614 (1990)). La acetilcolina inhibe la liberación de TNF- α y otras citoquinas en los macrófagos primarios, mediante un mecanismo dependiente de los receptores sensibles a la bungarotoxina (véase Borovikova et al., Nature, 405, 458-462 (2000)). Además, se requiere la subunidad del receptor de acetilcolina $\alpha 7$ nicotínico para la inhibición de la liberación de TNF- α por parte de los macrófagos (véase Wang et al., Nature, 4.21, 384-388 (2003)), y la inactivación de esta ruta puede contribuir a una excesiva liberación sistémica de citoquinas durante una endotoxemia u otro daño. Además, como el Mal de Meleda se caracteriza por un fenotipo clínico con una marcada inflamación cutánea y es debido a una SLURP-1 ausente o mutada, es probable que la SLURP-1 controle la liberación de TNF- α en los macrófagos dérmicos y en los queratinocitos mediante la activación de los receptores de acetilcolina nicotínicos, reduciendo de este modo la inflamación. Por tanto, la SLURP-1 o alteraciones de la misma (p.ej., mutaciones de punto, deleciones, etc.) pueden modificar la secreción de TNF- α por parte de los macrófagos y pueden modificar las respuestas inflamatorias.

El alto grado de homología estructural entre la SLURP-1 y la familia de proteínas con forma de tres dedos, combinado con la capacidad de la SLURP-1 de modular la actividad de los receptores de acetilcolina, indica que la SLURP-1 es también funcionalmente homóloga a las toxinas de los venenos. Por tanto, es útil para tratar o prevenir trastornos neurológicos o patologías de la piel, modular la homeostasis del calcio epidérmico y la proliferación y diferenciación de los queratinocitos, modular la secreción de TNF- α y modular las respuestas inflamatorias.

Usar SLURP-1 como neuromodulador

La presente invención proporciona el tratamiento de trastornos neurológicos en un paciente administrando una cantidad eficaz de SLURP-1 o una proteína relacionada con la SLURP-1 al paciente que padece el trastorno neurológico.

La presente invención también proporciona la prevención o el retraso del comienzo de trastornos neurológicos en un paciente administrando una cantidad eficaz de SLURP-1 o una proteína relacionada al paciente que padece el trastorno neurológico.

La presente invención proporciona además neuroprotección a un paciente administrando una cantidad eficaz de SLURP-1 o una proteína relacionada al paciente, donde la neuroprotección previene un trastorno neurológico causado por la disfunción de un receptor de acetilcolina.

Por ejemplo, el trastorno neurológico puede incluir cualquier patología causada por la disfunción de un receptor de acetilcolina. Tales trastornos incluyen, pero no se limitan a, dolor, dolor neuropático, esquizofrenia, daños cognitivos, enfermedad de Alzheimer y enfermedad de Parkinson. En una realización preferida, el receptor de acetilcolina es un receptor de acetilcolina nicotínico o un receptor de acetilcolina muscarínico. Preferiblemente, el receptor de acetilcolina nicotínico es un receptor de acetilcolina nicotínico alfa 7 ($\alpha 7$) o una proteína relacionada con el receptor de acetilcolina nicotínico alfa 7.

En los métodos y composiciones de la invención, la SLURP-1 tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2. En una realización preferida, la SLURP-1 está en una forma madura. Más preferiblemente, la forma madura de la SLURP-1 incluye los aminoácidos 23-103 de la SLURP-1.

Los términos "sujeto" o "paciente" están bien reconocidos en la técnica, y se usan de manera intercambiable en la presente memoria para referirse a un mamífero, que incluye perro, gato, rata, ratón, mono, vaca, caballo, cabra, oveja, cerdo, camello y, lo más preferiblemente, un ser humano. En algunas realizaciones, el paciente es un paciente necesitado de tratamiento. Sin embargo, en otras realizaciones, el paciente puede ser un sujeto normal, p.ej., un sujeto que no tiene un trastorno neurológico conocido o diagnosticado, p.ej., un sujeto neurológicamente libre de trastornos. Alternativamente, el sujeto tiene un trastorno neurológico conocido, diagnosticado o sospechado.

Los términos "tratar" o "prevenir" también están reconocidos en la técnica. Como se emplea en la presente memoria, estos términos se refieren a inhibir, reducir, aliviar o curar una dolencia (tal como un trastorno neurológico) para la que está indicado tal tratamiento. El progreso de tal tratamiento puede ser seguido, p.ej., por cualquier medición conocida en la técnica.

Un compuesto o composición farmacéutica de la invención (p.ej., SLURP-1 o una proteína relacionada con la SLURP-1) se puede administrar a un paciente en muchos de los bien conocidos métodos usados en la actualidad para el tratamiento de trastornos neurológicos. Por ejemplo, para el tratamiento de trastornos neurológicos, un compuesto de la invención se puede administrar por vía oral, intravenosa, intraperitoneal, intranasal o intramuscular. La dosis elegida debe ser suficiente para constituir un tratamiento eficaz, pero no tan alta como para causar efectos secundarios inaceptables. El estado de la condición de la enfermedad (p.ej., el trastorno neurológico) y la salud del sujeto/paciente deben ser preferiblemente seguidos estrechamente durante y por un periodo de tiempo razonable

después de la administración. La administración también puede incluir la administración de un vector de expresión capaz de expresar la proteína SLURP-1 o la proteína relacionada con la SLURP-1 en el sujeto/paciente.

5 El término "cantidad eficaz", bien conocido en la técnica, se usa en la presente memoria. Se refiere a una cantidad eficaz en conseguir un resultado deseado, tal como prevenir, tratar, inhibir, reducir, aliviar o curar. En una realización, un compuesto o composición farmacéutica de la invención (p.ej., SLURP-1, proteína relacionada con la SLURP-1, o un miembro de la familia Ly-6/uPAR secretada) se administra en una cantidad eficaz de aproximadamente 1,0 pM a aproximadamente 10 μ M. En otras realizaciones, la cantidad eficaz es aproximadamente 10 pM a aproximadamente 1 μ M; aproximadamente 1 pM a aproximadamente 100 nM; preferiblemente, aproximadamente 10 pM a aproximadamente 10 nM; o más preferiblemente, aproximadamente 100 pM a aproximadamente 1 nM.

15 Como se emplea en la presente memoria, una "proteína relacionada con la SLURP-1" es una proteína que muestra homología estructural a la SLURP-1 (SEQ ID NO:2) o una forma madura de SLURP-1 (p.ej., los aminoácidos 23-103 de SEQ ID NO:2). En una realización, una proteína relacionada con la SLURP-1 es aproximadamente 75% homóloga/idéntica a la SLURP-1 o una forma madura de SLURP-1. En otras realizaciones, una proteína relacionada con la SLURP-1 es aproximadamente 80% homóloga/idéntica; aproximadamente 85% homóloga/idéntica; preferiblemente, aproximadamente 90% homóloga/idéntica; más preferiblemente, aproximadamente 95% homóloga/idéntica o, lo más preferiblemente, aproximadamente 99% homóloga/idéntica. En una realización preferida, una proteína relacionada con la SLURP-1 es funcionalmente homóloga a la SLURP-1 o una forma madura de SLURP-1.

25 La homología/identidad se mide, por regla general, usando un software de análisis de secuencias (p.ej., Sequence Analysis Software Package del Genetics Computer Group, University of Wisconsin Biotechnology Center, 1710 University Avenue, Madison, WI 53705). Se alinean secuencias de aminoácidos similares para obtener el máximo grado de homología (es decir, identidad). Para este fin, puede ser necesario introducir artificialmente huecos en la secuencia. Una vez que se ha establecido el alineamiento óptimo, se establece el grado de homología (es decir, identidad) registrando todas las posiciones en las que los aminoácidos de ambas secuencias son idénticos, en relación al número total de posiciones.

30 Los factores de similitud incluyen tamaño, forma y carga eléctrica similares. Un método particularmente preferido para determinar similitudes de aminoácidos es la matriz PAM250, descrita en Dayhoff et al., 5 Atlas Of Protein Sequence And Structure 345-352 (1978 & Suppl.), incorporado por referencia en la presente memoria. Se calcula primero una puntuación de similitud como la suma de las puntuaciones de similitud de aminoácidos alineados por pares. Las inserciones o deleciones se ignoran para los fines de porcentaje de homología e identidad. Por consiguiente, no se usan penalizaciones por huecos ("gap penalties") en este cálculo. La puntuación bruta se normaliza después dividiéndola por la media geométrica de las puntuaciones del compuesto candidato y la secuencia de referencia. La media geométrica es la raíz cuadrada del producto de estas puntuaciones. La puntuación bruta normalizada es el porcentaje de homología.

40 Usar SLURP-1 para tratar o prevenir patologías de la piel

La presente invención proporciona adicionalmente el tratamiento de patologías de la piel causadas por la disfunción de un receptor de acetilcolina expresado en la piel, administrando una cantidad eficaz de SLURP-1 o una proteína relacionada con la SLURP-1 a un paciente que padece la patología de la piel.

45 Además, la presente invención también proporciona la prevención o el retraso del comienzo de patologías de la piel causadas por la disfunción de un receptor de acetilcolina expresado en la piel, administrando una cantidad eficaz de SLURP-1 o una proteína relacionada con la SLURP-1 a un paciente en riesgo de desarrollar o padecer la patología de la piel.

50 También se describe la modulación de la homeostasis epidérmica del calcio poniendo en contacto el receptor de acetilcolina con una cantidad eficaz de SLURP-1, donde la cantidad eficaz de SLURP-1 es de aproximadamente 1 pM a aproximadamente 10 μ M.

55 La presente invención proporciona además la modulación de la proliferación y diferenciación de los queratinocitos poniendo en contacto el receptor de acetilcolina con una cantidad eficaz de SLURP-1 o una proteína relacionada con la SLURP-1, donde la cantidad eficaz es de aproximadamente 1 pM a aproximadamente 10 μ M.

60 La invención también proporciona la modulación de la secreción de TNF- α poniendo en contacto el receptor de acetilcolina con una cantidad eficaz SLURP-1 o una proteína relacionada con la SLURP-1, donde la cantidad eficaz es de aproximadamente 1 pM a aproximadamente 10 μ M.

65 Además, la invención también proporciona la modulación de una respuesta inflamatoria poniendo en contacto el receptor de acetilcolina con una cantidad eficaz de SLURP-1 o una proteína relacionada con la SLURP-1, donde la cantidad eficaz es de aproximadamente 1 pM a aproximadamente 10 μ M.

Preferiblemente, el receptor de acetilcolina es un receptor de acetilcolina nicotínico o un receptor de acetilcolina muscarínico. Por ejemplo, el receptor de acetilcolina nicotínico es un receptor de acetilcolina nicotínico alfa 7 o una proteína relacionada con el receptor de acetilcolina nicotínico alfa 7.

5 En una realización, la SLURP-1 que se administra a un paciente tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2. En una realización preferida, la SLURP-1 está en una forma madura. Los expertos en la técnica reconocerán que la forma madura de SLURP-1 incluye los aminoácidos 23-103 de SEQ ID NO:2.

10 Preferiblemente, el paciente es un mamífero. Más preferiblemente, el paciente es un ser humano. El paciente puede ser un paciente necesitado de tratamiento, o el paciente puede ser un sujeto normal, p.ej., un sujeto que no tiene patologías de la piel conocidas o diagnosticadas, p.ej., un sujeto libre de patologías de la piel. En otras realizaciones, el sujeto tiene una patología de la piel conocida, diagnosticada o sospechada. La patología de la piel puede incluir, pero no se limita a, Mal de Meleda, cicatrización o psoriasis. Los expertos en la técnica reconocerán que los métodos y composiciones descritos en la presente memoria se pueden usar para tratar o prevenir cualquier patología de la piel que es resultado de una disfunción de un receptor de acetilcolina expresado en la piel.

15 Un compuesto o composición farmacéutica de la invención (p.ej., SLURP-1 o una proteína relacionada con la SLURP-1) se puede administrar a un paciente en muchos de los bien conocidos métodos usados en la actualidad para el tratamiento de patologías de la piel. Por ejemplo, para el tratamiento de patologías de la piel, un compuesto de la invención se puede administrar por vía oral, intravenosa, intraperitoneal, intranasal o intramuscular. La dosis elegida debe ser suficiente para constituir un tratamiento eficaz, pero no tan alta como para causar efectos secundarios inaceptables. La selección de una dosis apropiada está dentro de la experiencia de los expertos en la técnica. El estado de la condición de la enfermedad (p.ej., la patología de la piel) y la salud del sujeto/paciente debe ser preferiblemente estrechamente seguido durante y en un periodo de tiempo razonable después de la administración. La administración también puede incluir la administración de un vector de expresión capaz de expresar la proteína SLURP-1 o proteína relacionada con la SLURP-1.

20 Por ejemplo, un compuesto o composición farmacéutica de la invención (p.ej., SLURP-1, proteína relacionada con la SLURP-1) es para ser administrada en una cantidad eficaz de aproximadamente 1,0 pM a aproximadamente 10 μM. En otras realizaciones, la cantidad eficaz es aproximadamente 10 pM a aproximadamente 1 μM; aproximadamente 1 pM a aproximadamente 100 nM; preferiblemente, aproximadamente 10 pM a aproximadamente 10 nM; o más preferiblemente, aproximadamente 100 pM a aproximadamente 1 nM.

35 Composiciones de SLURP-1 para tratar o prevenir trastornos neurológicos o patolo- gías de la piel

La presente invención también describe composiciones que incluyen una cantidad eficaz de SLURP-1, un mimético de la SLURP-1, una proteína relacionada con la SLURP-1, o una combinación de los mismos y un vehículo, donde la composición modula la función de un receptor de acetilcolina nicotínico alfa 7 o de una proteína relacionada. Las composiciones se describen como parte de un kit.

40 Asimismo, la presente invención también proporciona el tratamiento de un trastorno neurológico causado por la disfunción del receptor de acetilcolina nicotínico alfa 7 administrando una composición de la presente invención al paciente que padece el trastorno neurológico.

45 También se proporciona la prevención o el retraso del comienzo de un trastorno neurológico causado por la disfunción del receptor de acetilcolina nicotínico alfa 7, administrando una composición de la presente invención al paciente en riesgo de desarrollar o padecer el trastorno neurológico.

50 La presente invención proporciona además el tratamiento de una patología de la piel causada por la disfunción de un receptor de acetilcolina nicotínico alfa 7 expresado en la piel, administrando una composición de la presente invención al paciente que padece la patología de la piel.

55 Además, la presente invención también proporciona la prevención o el retraso del comienzo de una patología de la piel causada por la disfunción de un receptor de acetilcolina nicotínico alfa 7 expresado en la piel, administrando una composición de la presente invención al paciente en riesgo de desarrollar o padecer la patología de la piel.

60 Los métodos y composiciones de la presente invención también engloban péptidos miméticos de la SLURP-1 (peptidomiméticos), y péptidos miméticos de proteínas relacionadas con la SLURP-1. Las técnicas para el desarrollo de péptidos miméticos son bien conocidas en la técnica. (Véase por ejemplo, Navia y Peattie, Trends Pharm Sci 14: 189-195, 1993; Olson et al, J Med Chem 36: 3039-3049). Específicamente, usando la secuencia de aminoácidos de la SLURP-1, o proteína relacionada con la SLURP-1, tecnologías de cristalografía de rayos X y resonancia magnética nuclear, junto con modelado molecular computerizado, se desarrolla una hipótesis farmacófora y se preparan y ensayan compuestos peptídicos miméticos en un sistema de ensayo.

65 Por ejemplo, la invención incluye compuestos o composiciones de la invención de SLURP-1 en los que uno o más enlaces peptídicos han sido reemplazados por un tipo alternativo de enlace covalente (un "péptido mimético"), que no es susceptible a la escisión por peptidasas. Donde la degradación proteolítica de los péptidos después de la

inyección en un paciente es un problema, el reemplazo de un enlace peptídico particularmente sensible por un péptido mimético no escindible hace al péptido resultante más estable y por tanto más útil como agente terapéutico. Tales miméticos, y los métodos para incorporarlos en péptidos, son bien conocidos en la técnica. De manera similar, el reemplazo de un residuo de L-aminoácido es una manera estándar de hacer al péptido menos sensible a la proteólisis. Las interacciones moleculares de un péptido mimético son similares a las de la molécula existente en la naturaleza.

Los compuestos, composiciones o composiciones farmacéuticas de la invención (p.ej., SLURP-1, proteína relacionada con la SLURP-1, y derivados, fragmentos, análogos y homólogos de los mismos) se pueden incorporar en composiciones adecuadas para la administración. Tales composiciones comprenden, por regla general, la molécula de ácido nucleico, o proteína, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Como se emplea en la presente memoria, "vehículo" o "vehículo farmacéuticamente aceptable" pretenden incluir cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, revestimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción, y similares, compatibles con la administración farmacéutica. Se describen vehículos adecuados en la edición más reciente de Remington's Pharmaceutical Sciences, un texto de referencia estándar en el campo, que se incorpora en la presente memoria por referencia. Los ejemplos preferidos de tales vehículos o diluyentes incluyen, pero no se limitan a, agua, suero salino, disoluciones de glicerol, disolución de dextrosa, y albúmina de suero humana al 5%. También se pueden usar liposomas y vehículos no acuosos, tales como aceites fijos. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es bien conocido en la técnica. Excepto en tanto que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el compuesto activo, el uso del mismo en las composiciones está contemplado. También se pueden incorporar compuestos activos suplementarios en las composiciones.

Una composición farmacéutica de la invención se formula para que sea compatible con su ruta de administración pretendida. Los ejemplos de rutas de administración incluyen administración parenteral, p.ej., intravenosa, intradérmica, subcutánea, oral (p.ej., inhalación), transdérmica (tópica), transmucosal y rectal. Las disoluciones o suspensiones usadas para aplicación parenteral, intradérmica o subcutánea pueden incluir los siguientes componentes: un diluyente estéril, tal como agua para inyección, disolución salina, aceite fijos, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros disolventes sintéticos; agentes antibacterianos, tales como alcohol bencílico o metilparabenos; antioxidantes, tales como ácido ascórbico o bisulfito de sodio; agentes quelantes, tales como ácido etilendiaminotetraacético; amortiguadores, tales como acetatos, citratos o fosfatos, y agentes para el ajuste de la tonicidad, tales como cloruro de sodio o dextrosa. El pH se puede ajustar con ácidos o bases, tales como ácido clorhídrico o hidróxido de sodio. La preparación parenteral puede ser encerrada en ampollas, jeringas desechables o viales de dosis múltiple hechos de vidrio o plástico.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para el uso inyectable incluyen soluciones acuosas estériles (donde sean solubles en agua) o dispersiones y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. Para administración intravenosa, los vehículos adecuados incluyen suero salino fisiológico, agua bacteriostática, Cremophor EL™ (BASF, Parsippany, N.J.) o suero salino tamponado con fosfato (PBS). En todos los casos, la composición debe ser estéril y debe ser fluida hasta el punto en que exista una inyectabilidad fácil. Debe ser estable bajo las condiciones de fabricación y almacenamiento, y deben ser preservadas contra la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos. El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez apropiada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un revestimiento tal como lecitina, por el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de la dispersión y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de los microorganismos se puede llevar a cabo mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal y similares. En muchos casos, será preferible incluir en la composición agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol, y cloruro de sodio. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede llevar a cabo incluyendo en la composición un agente que retrase la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Las soluciones inyectables estériles se pueden preparar incorporando un compuesto o composición farmacéutica de la invención (p.ej., SLURP-1 o una proteína relacionada con la SLURP-1), en la cantidad requerida, en un disolvente apropiado con uno o una combinación de los ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de una esterilización por filtración. De manera general, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de disoluciones inyectables estériles, los métodos de preparación son el secado al vacío y la liofilización, que proporcionan un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado a partir de una disolución esterilizada por filtración previamente del mismo.

Las composiciones orales incluyen, de manera general, un diluyente inerte o un vehículo comestible. Se pueden encerrar en cápsulas de gelatina o comprimir en comprimidos. Para el fin de la administración terapéutica oral, el compuesto activo se puede incorporar con excipientes y usar en la forma de comprimidos, grageas o cápsulas. Las composiciones orales también se pueden preparar usando un vehículo fluido para el uso como enjuague bucal, en donde el compuesto en el vehículo fluido se aplica por vía oral y se hacen gárgaras y se expulsa o se traga. Se

pueden incluir agentes aglutinantes farmacéuticamente compatibles, y/o materiales adyuvantes como parte de la composición. Los comprimidos, píldoras, cápsulas, grageas y similares pueden contener cualquiera de los siguientes ingredientes, o compuestos de una naturaleza similar: un aglutinante, tal como celulosa microcristalina, goma de tragacanto o gelatina; un excipiente, tal como almidón o lactosa, un agente disgregante, tal como ácido algínico, Primogel o almidón de maíz; un lubricante, tal como estearato de magnesio o Sterotes; un deslizante, tal como dióxido de silicio coloidal; un agente edulcorante, tal como sacarosa o sacarina; o un agente aromatizante, tal como menta piperita, salicilato de metilo o aroma de naranja.

Para la administración por inhalación, los compuestos se entregan en la forma de un pulverizador de aerosol desde un recipiente o dispensador presurizado que contiene un propelente adecuado, p.ej., un gas tal como dióxido de carbono, o un nebulizador.

La administración sistémica también puede ser por medios transmucosales o transdérmicos. Para administración transmucosal o transdérmica, se usan en la formulación agentes penetrantes apropiados para la barrera a ser permeada. Tales agentes penetrantes se conocen de manera general en la técnica, e incluyen, por ejemplo, para administración transmucosal, detergentes, sales biliares, y derivados del ácido fusídico. La administración transdérmica se puede llevar a cabo mediante el uso de pulverizadores nasales o supositorios. Para la administración transdérmica, los compuestos activos se formulan en pomadas, ungüentos, geles o cremas como las que se conocen de manera general en la técnica.

Los compuestos también se pueden preparar en la forma de supositorios (p.ej., con bases para supositorios convencionales tales como manteca de cacao y otros glicéridos) o enemas de retención para la entrega rectal.

En una realización, los compuestos activos se preparan con vehículos que protegerán al compuesto contra la eliminación rápida del cuerpo, tal como una formulación de liberación controlada, que incluye implantes y sistemas de entrega microencapsulados. Se pueden usar polímeros biocompatibles, biodegradables, tal como etileno y acetato de vinilo, polianhídridos, poli(ácido glicólico), colágeno, poliortoésteres y poli(ácido láctico). Los métodos para la preparación de tales formulaciones serán evidentes para los expertos en la técnica. Los materiales también se pueden obtener en el mercado en Alza Corporation y Nova Pharmaceuticals, Inc. También se pueden usar suspensiones liposomiales (que incluyen liposomas dirigidos a células infectadas con anticuerpos monoclonales a antígenos virales) como vehículos farmacéuticamente aceptables. Estos se pueden preparar según métodos conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, como se describe en la patente de EE.UU. N° 4.522.811.

Es especialmente ventajoso formular composiciones orales o parenterales en forma de dosificación unitaria, por facilidad de administración y uniformidad de dosificación. Forma de dosificación unitaria, como se emplea en la presente memoria, se refiere a unidades físicamente discretas adaptadas como dosificaciones unitarias para el paciente a ser tratado; conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado, en asociación con el vehículo farmacéutico requerido. La especificación para las formas de dosificación unitaria de la invención son dictadas por, y directamente dependientes de, las características únicas del compuesto activo y el efecto terapéutico particular a conseguir.

Las composiciones de la invención se pueden incluir en un kit, recipiente, envase o dispensador junto con instrucciones para la administración.

Otro aspecto de la invención se refiere a vectores, preferiblemente vectores de expresión, que contienen un ácido nucleico que codifica una proteína SLURP-1, una proteína relacionada con la SLURP-1, o derivados, fragmentos, análogos u homólogos de los mismos. Como se emplea en la presente memoria, el término "vector" se refiere a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al cual ha sido enlazada. Un tipo de vector es un "plásmido", el cual se refiere a un bucle de ADN de doble hebra circular en el que se pueden ligar segmentos de ADN adicionales. Otro tipo de vector es un vector viral, en donde se pueden ligar segmentos de ADN en el genoma viral. Ciertos vectores son capaces de tener una replicación autónoma en una célula huésped en la cual son introducidos (p.ej., vectores bacterianos que tienen un origen de replicación bacteriano y vectores episomales de mamíferos). Otros vectores (p.ej., vectores no episomales de mamíferos) se integran en el genoma de una célula huésped tras la introducción en la célula huésped, y de este modo son replicados junto con el genoma del huésped. Además, ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de los genes a los que están enlazados de manera operativa. Tales vectores se denominan en la presente memoria "vectores de expresión". En general, los vectores de expresión de utilidad en las técnicas de ADN recombinante están a menudo en la forma de plásmidos. En la presente memoria descriptiva, "plásmido" y "vector" se pueden usar de manera intercambiable, ya que el plásmido es la forma de vector usada más comúnmente. Sin embargo, la invención pretende incluir tales otras formas de vectores de expresión, tales como vectores virales (p.ej., retrovirus defectivos de replicación, adenovirus y virus adeno-asociados), que realizan funciones equivalentes.

Los vectores de expresión recombinantes de la invención se pueden diseñar para la expresión de una proteína SLURP-1 o una proteína relacionada con la SLURP-1. Por ejemplo, las proteínas se pueden expresar en células bacterianas tales como *Escherichia coli*, células de insectos (usando vectores de expresión de baculovirus) células de levadura o células de mamíferos. Se discuten adicionalmente células huésped adecuadas en Goeddel, GENE

EXPRESSION TECHNOLOGY: METHODS IN ENZYMOLOGY 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990), Alternativamente, el vector de expresión recombinante se puede transcribir y traducir *in vitro*, por ejemplo usando secuencias regulatorias del promotor T7 y polimerasa T7.

5 Métodos de usar SLURP-1 para modular la actividad del receptor de acetilcolina

10 La presente invención también proporciona la modulación de un receptor de acetilcolina poniendo en contacto el receptor de acetilcolina con una cantidad eficaz de SLURP-1 o una proteína relacionada con la SLURP-1, donde la cantidad eficaz es de aproximadamente 1 pM a aproximadamente 10 μM. En una realización preferida, la modulación del receptor de acetilcolina restablece la función apropiada del receptor de acetilcolina.

15 Por ejemplo, el receptor de acetilcolina es un receptor de acetilcolina nicotínico o un receptor de acetilcolina muscarínico. Preferiblemente, el receptor de acetilcolina nicotínico es un receptor de acetilcolina nicotínico alfa 7 o una proteína relacionada con el receptor de acetilcolina nicotínico alfa 7.

La SLURP-1 tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2. En una realización preferida, la SLURP-1 está en una forma madura. Más preferiblemente, la forma madura de la SLURP-1 incluye los aminoácidos 23-103 de SEQ ID NO:2.

20 Los términos "modular" o "modulación" están reconocidos en la técnica. Como se emplea en la presente memoria, esto se refiere a estimular, inducir, regular en ascenso, potenciar o disminuir, inhibir, reducir, reprimir. Como se emplea en la presente memoria, un "modulador" es una molécula que estimula (es decir, induce, potencia o regula en ascenso) o inhibe (es decir, reduce, reprime o disminuye) la actividad de un receptor de acetilcolina.

25 Métodos de cribado para moduladores de la actividad del receptor de acetilcolina

30 La presente invención describe un método de cribado para un modulador de la actividad del receptor de acetilcolina a) exponiendo un primer receptor de acetilcolina a un compuesto candidato y midiendo la actividad del primer receptor de acetilcolina después de la exposición, b) exponiendo un segundo receptor de acetilcolina a una cantidad eficaz de SLURP-1 o un compuesto relacionado y midiendo la actividad del segundo receptor de acetilcolina después de la exposición, y c) comparando la actividad del primer receptor de acetilcolina después de la primera exposición con la actividad del segundo receptor de acetilcolina después de la exposición a SLURP-1 o un compuesto relacionado. Si la actividad del primer receptor de acetilcolina es similar a la actividad del segundo receptor de acetilcolina después de la exposición, entonces el compuesto candidato es un modulador de la actividad del receptor de acetilcolina.

35 El receptor de acetilcolina puede ser un receptor de acetilcolina nicotínico o un receptor de acetilcolina muscarínico. Preferiblemente, el receptor de acetilcolina nicotínico es un receptor de acetilcolina nicotínico alfa 7 o una proteína relacionada con el receptor de acetilcolina nicotínico alfa 7.

40 La SLURP-1 tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2. En una realización preferida, la SLURP-1 está en una forma madura. La forma madura de SLURP-1 incluye los aminoácidos 23-103 de SEQ ID NO:2.

45 Por regla general, un compuesto de la invención (p.ej., SLURP-1 o una proteína relacionada con la SLURP-1, forma una disolución para entrar en contacto con el receptor de acetilcolina en una cantidad eficaz de aproximadamente 1,0 pM a aproximadamente 10 μM. En otras realizaciones, la cantidad eficaz es aproximadamente 10 pM a aproximadamente 1 μM; aproximadamente 1 pM a aproximadamente 100 nM; preferiblemente 10 pM a aproximadamente 10 nM; o más preferiblemente 100 pM a aproximadamente 1 nM.

50 Anticuerpos anti-SLURP

55 La presente invención también describe anticuerpos que tienen una alta afinidad de unión específica a la SLURP-1. El anticuerpo puede ser, p.ej., monoclonal, policlonal o humanizado. Por ejemplo, la alta afinidad de unión específica se puede representar por una constante de disociación menor que $5,0 \times 10^{-5}$ M. Preferiblemente, la alta afinidad de unión específica se representa por una constante de disociación menor que $5,0 \times 10^{-7}$ M. Más preferiblemente, la alta afinidad de unión específica se representa por una constante de disociación menor que $5,0 \times 10^{-9}$ M.

60 El término "anticuerpo", como se emplea en la presente memoria, se refiere a moléculas de inmunoglobulina y porciones inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulina (Ig), es decir, moléculas que contienen un sitio de unión con un antígeno que se une de manera específica (inmunorreacciona con) un antígeno. Tales anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, policlonales, monoclonales, quiméricos, de cadena única, fragmentos F_{ab} , F_{ab}' y $F_{(ab)2}$, y una librería de expresión de F_{ab} . En general, una molécula de anticuerpo obtenida de seres humanos pertenece a cualquiera de las clases IgG, IgM, IgA, IgE y IgD, que difieren unas de otras por la naturaleza de la cadena pesada presente en la molécula. Ciertas clases tienen subclases también, tales como IgG₁, IgG₂, y otras. Además, en los seres humanos, la cadena ligera puede ser una cadena kappa o una cadena lambda. Las

referencias en la presente memoria a anticuerpos incluyen una referencia a todas las tales clases, subclases y tipos de especies de anticuerpos humanos.

5 Una proteína SLURP-1 aislada, proteína relacionada con la SLURP-1, o péptido mimético de la SLURP-1 de la invención puede servir como antígeno, o una porción o fragmento del mismo, y adicionalmente se puede usar como inmunógeno para generar anticuerpos que se unan de manera inmuno-específica al antígeno, usando técnicas estándar para la preparación de anticuerpos policlonales y monoclonales. Se puede usar la proteína de longitud completa o, alternativamente, la invención proporciona fragmentos peptídicos antigénicos del antígeno para el uso como inmunógenos. Un fragmento peptídico antigénico comprende al menos 6 residuos de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de la proteína de longitud completa, y engloba un epítipo de la misma, de tal modo que un anticuerpo generado contra el péptido forma un complejo inmune específico con la proteína de longitud completa o con cualquier fragmento que contenga el epítipo. Por epítipo se hace referencia a un determinante antigénico de un polipéptido. Por regla general, los epítopos contienen aminoácidos hidrófilos, de tal modo que la región particular del polipéptido está localizada en su superficie y es susceptible de ser expuesta en un entorno de base acuosa. Preferiblemente, el péptido antigénico comprende al menos 3 residuos de aminoácidos en una conformación espacial que es única para el epítipo. De manera general, el péptido antigénico comprende al menos 5 residuos de aminoácidos, o al menos 10 residuos de aminoácidos, o al menos 15 residuos de aminoácidos, o al menos 20 residuos de aminoácidos, o al menos 30 residuos de aminoácidos. Además, los anticuerpos para una proteína SLURP-1, proteína relacionada con la SLURP-1, o péptido mimético de la SLURP-1 o fragmentos de los mismos también pueden ser generados contra oligopéptidos que incluyan una región conservada.

El análisis de hidrofobicidad de una proteína SLURP-1, proteína relacionada con la SLURP-1 o secuencia peptídica mimética de la SLURP-1 indicará qué regiones son particularmente hidrófilas y, por tanto, son susceptibles de codificar residuos superficiales útiles para acceder a la producción de anticuerpos. Como medio para acceder a la producción de anticuerpos, se pueden generar por cualquier medio conocido en la técnica gráficos de hidropatía que muestren regiones de hidrofiliidad e hidrofobicidad, medios que incluyen, por ejemplo, los métodos de Kyte Doolittle o de Hopp Woods, con o bien sin transformación de Fourier. Véase, p.ej., Hopp y Woods, 1981, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 78: 3824-3825; Kyte y Doolittle 1982, J. Mol. Biol. 157: 105-142. Los anticuerpos que son específicos para uno o más dominios dentro de una proteína antigénica, o derivados, fragmentos, análogos u homólogos de la misma, también se describen en la presente memoria. Una proteína de la invención, o un derivado, fragmento, análogo, homólogo u ortólogo de la misma, se puede utilizar como inmunógeno en la generación de anticuerpos que se unen de manera inmuno-específica a estos componentes proteicos.

Se pueden usar diversos procedimientos conocidos en la técnica para la producción de anticuerpos policlonales o monoclonales dirigidos contra una proteína de la invención, o contra derivados, fragmentos, análogos, homólogos u ortólogos de la misma (véase por ejemplo, Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow E, y Lane D, 1988, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY). Algunos de estos anticuerpos se discuten más adelante.

Para la producción de anticuerpos policlonales, se pueden inmunizar diversos animales huéspedes adecuados (p.ej., conejo, cabra, ratón u otro mamífero) mediante una o más inyecciones con la proteína nativa, una variante sintética de la misma, o un derivado de los anteriores. Una preparación inmunogénica apropiada puede contener, por ejemplo, la proteína inmunogénica natural, un polipéptido sintetizado químicamente que representa la proteína inmunogénica, o una proteína inmunogénica expresada de manera recombinante. Además, la proteína puede ser conjugada a una segunda proteína conocida por ser inmunogénica en el mamífero que se inmuniza. Los ejemplos de dichas proteínas inmunogénicas incluyen, pero no se limitan a, hemocianina de lapa californiana, albúmina de suero, tiroglobulina bovina e inhibidor de tripsina de semilla de soja. La preparación puede incluir además un adyuvante. Diversos adyuvantes usados para aumentar la respuesta inmunológica incluyen, pero no se limitan a, adyuvante de Freund (completo e incompleto), geles minerales (p.ej., hidróxido de aluminio), sustancias activadoras de superficies (p.ej., lisolecitina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, emulsiones de aceites, dinitrofenol, etc.), adyuvantes utilizables en seres humanos, tales como Bacille Calmette-Guerin y Corynebacterium parvum, o agentes inmunoestimulatorios similares. Ejemplos adicionales de adyuvantes que se pueden emplear incluyen el adyuvante MPL-TDM (monofosforil Lípido A, dicorinomicolato de trehalosa sintético) y motivos de dinucleótidos CpG (véase, Krieg, A.M. Biochim Biophys Acta 1489 (1):107-16, 1999). Las moléculas de anticuerpos policlonales dirigidas contra la proteína inmunogénica pueden ser aislados del mamífero (p.ej. de la sangre) y purificados posteriormente por técnicas bien conocidas, tales como cromatografía de afinidad usando proteína A o proteína G, que proporcionan principalmente la fracción IgG del suero inmune. Posteriormente, o alternativamente, el antígeno específico que es la diana de la inmunoglobulina buscada, o un epítipo de la misma, puede ser inmovilizado en una columna para purificar el anticuerpo específico inmune por cromatografía de inmunoafinidad. La purificación de inmunoglobulinas es discutida, por ejemplo, por D. Wilkinson (The Scientist, publicado por The Scientist, Inc., Philadelphia PA, Vol. 14, No. 8 (17 de abril de 2000), págs. 25-28).

El término "anticuerpo monoclonal" (MAb) o "composición de anticuerpo monoclonal", como se emplea en la presente memoria, se refiere a una población de moléculas de anticuerpo que contienen sólo una especie molecular de molécula de anticuerpo que consiste en un producto génico de cadena ligera único y un producto génico de cadena pesada único. En particular, las regiones determinantes de la complementariedad (CDRs) del anticuerpo monoclonal son idénticas en todas las moléculas de la población. Los anticuerpos monoclonales, por tanto, contienen un sitio de unión con el antígeno capaz de inmunorreactar con un epítipo particular del antígeno

5 caracterizado por una única afinidad de unión por él. Los anticuerpos monoclonales se pueden preparar usando métodos de hibridoma, tales como los descritos por Kohler y Milstein, *Nature*, 256:495 (1975). En un método de hibridoma, un ratón, hámster u otro animal huésped apropiado, es inmunizado típicamente con un agente inmunizante para obtener linfocitos que producen o son capaces de producir anticuerpos que se unirán de manera específica al agente inmunizante. Alternativamente, los linfocitos pueden ser inmunizados *in vitro*.

10 Los anticuerpos monoclonales también se pueden preparar por métodos de ADN recombinante, tales como los descritos en la patente de EE.UU. N° 4.816.567. El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales de la invención se puede aislar y secuenciar fácilmente usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas de oligonucleótidos que sean capaces de unirse específicamente a los genes que codifican las cadenas pesada y ligera de anticuerpos murinos). Las células de hibridoma de la invención sirven como una fuente preferida de dicho ADN. Una vez que se aísla, el ADN se puede poner en vectores de expresión, que se transfectan después en células huésped tales como células COS de simios, células de ovario de hámster chino (CHO), o células de mieloma que no producen por otro lado la proteína de inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células huésped recombinantes. El ADN también se puede modificar, por ejemplo, sustituyendo la secuencia codificante por dominios constantes de cadenas pesadas y ligeras humanas en lugar de las secuencias murinas homólogas (patente de EE.UU. N° 4.816.567; Morrison, *Nature* 368, 812-13 (1994)) o uniendo de manera covalente a la secuencia codificante de la inmunoglobulina todo o parte de la secuencia codificante para un polipéptido no inmunoglobulínico. Tal polipéptido no inmunoglobulínico puede ser sustituido por los dominios constantes de un anticuerpo de la invención, o pueden ser sustituidos por los dominios variables de un sitio combinante con antígeno de un anticuerpo de la invención para crear un anticuerpo bivalente quimérico.

25 Los anticuerpos dirigidos contra los antígenos proteicos de la invención pueden comprender además anticuerpos humanizados o anticuerpos humanos. Estos anticuerpos son adecuados para la administración a seres humanos sin engendrar una respuesta inmune por parte del ser humano contra la inmunoglobulina administrada. Las formas humanizadas de anticuerpos son inmunoglobulinas quiméricas, cadenas inmunoglobulínicas o fragmentos de las mismas (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ u otras subsecuencias de anticuerpos de unión a antígenos) que están comprendidas principalmente de la secuencia de una inmunoglobulina humana, y contienen una secuencia mínima derivada de una inmunoglobulina no humana. La humanización se puede realizar siguiendo el método de Winter y colaboradores (véase Jones et al., *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature*, 332:323-327 (1988); Verhoeyen et al., *Science*, 239:1534-1536 (1988)), sustituyendo CDRs o secuencias de CDR de roedores por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. (Véase también la patente de EE.UU. N° 5.225.539.) El anticuerpo humanizado también comprenderá óptimamente al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana (véase Jones et al., 1986; Riechmann et al., 1988; y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2:593-596 (1992)).

La invención será descrita adicionalmente en los siguientes ejemplos, que no limitan el alcance de la invención descrita en las reivindicaciones.

40 EJEMPLOS

Ejemplo 1

45 Para evaluar si la SLURP-1 es un péptido secretado y determinar la presencia de un sitio de escisión putativo de la secuencia señal, se produjo una proteína SLURP-1 recombinante con una etiqueta de hemaglutinina (HA) N-terminal y una etiqueta myc C-terminal. Específicamente, se construyeron plásmidos. Específicamente, para la expresión en células de mamíferos, el ADNc que codifica para la SLURP-1 se modificó por PCR para añadir sitios de restricción 5'*Hind*III y 3'*Xba*I en sus términos con los siguientes cebadores:

50 sentido, 5'-AAGCTTGGAGCAATGGCCTCTCGCTGG (SEQ ID NO:3) y
antisentido, 5'-TCTAGAGAGTCCGAGTTGCAGAGGTC (SEQ ID NO:4).

Los fragmentos de PCR se purificaron a partir de geles de agarosa y se ligaron en pBudCE4 digerido por *Hind*III y *Xba*I (Invitrogen) para dar el plásmido pBud-SLURP-1, lo que permitió la adición de una etiqueta myc C-terminal para la detección por análisis western y una etiqueta His₆ para purificación. Para generar la proteína SLURP-1 recombinante con etiquetas en ambos términos N y C, el ADNc que codifica para la SLURP-1 se amplificó a partir de pBud-SLURP-1 por PCR usando cebadores que contenían sitios de restricción 5'*Eco*RV y 3'*Bgl*II en sus términos y que incluían la etiqueta myc. Se usaron los siguientes cebadores:

60 sentido, 5'-GAGATATCGGAGCAATGGCC-TCTCG (SEQ ID NO:5) y
antisentido, 5'-AGAGATCTTCACAGATCCTCTT-CTGAGATG AGTTT (SEQ ID NO:6).

Los fragmentos de PCR se purificaron a partir de geles de agarosa y se ligaron en pCRUZ-HA digerido por *Eco*RV y *Bgl*II (Santa Cruz), para generar pCSLURP-1, lo que permitió la adición de una etiqueta de hemaglutinina (HA) N-terminal.

Los plásmidos resultantes se usaron después para transformar células XL1-Blue competentes. Se escogieron colonias simples, y se aisló y purificó ADN plásmido usando reactivos de Qiagen según las instrucciones del fabricante. Para la expresión en células de insectos, el plásmido pBud-SLURP-1 fue digerido por *HindIII* y *EcoRV*. El fragmento correspondiente al ADNc de la SLURP-1 con una etiqueta myc en el término C se purificó a partir de geles de agarosa y se ligó en pIZ digerido por *HindIII* y *XbaI* (Invitrogen), generando así pIG-SLURP-1, que codifica para la misma proteína que el pBud-SLURP-1, incluyendo las etiquetas myc y His₆. La correcta inserción y la clonación en marco de todos los plásmidos se verificó por secuenciación.

Se cultivaron células HEK 293T (ATCC CRL-11268) en medio de Eagle modificado con Dulbecco's suplementado con suero de ternero fetal al 10% (Gibco), L-glutamina 2 mM, 100 unidades/ml de penicilina, y 100 mg/ml de estreptomicina, a 37°C en una atmósfera humidificada de CO₂ al 5%. Las células se recolectaron por tripsinización cuando fueron ~90% confluentes y se pusieron en placa a relaciones de división de 1:5. Se generaron líneas celulares estables que expresaban SLURP-1 mediante la transfección con fosfato de calcio de pBud-SLURP-1 como se describió previamente (véase Jordan et al., Nucl. Acids Res., 24, 596-601 (1996)) y la selección con Zeocina. Se aislaron líneas celulares clonales por el método de dilución. Se mantuvieron células *Trichoplusia ni* (HighFive, Invitrogen) a 27°C en medio Express Five[®] SFM (Life Technologies). Para generar líneas celulares estables, se transfectaron 10 µg de pIZ-SLURP-1 en células HighFive con Cellfecti[™] según las instrucciones del fabricante. Se añadió zeocina 48 h después para la selección. Las líneas celulares clonales se aislaron con cilindros de clonación.

La proteína SLURP-1 recombinante producida con una etiqueta de hemaglutinina (HA) N-terminal y una etiqueta myc C-terminal se muestra en la Figura 1A. Después de la transfección transitoria de células 293T con el constructo, la SLURP-1 fue identificada 48 h después en el medio de cultivo por inmunoblotting con anticuerpos anti-myc (véase la Figura 1B). Como se muestra en la Figura 1B, el inmunoblotting con anticuerpos anti-HA no indicó la presencia de SLURP-1 en el medio de cultivo. Estos resultados muestran que la secuencia señal de la SLURP-1 es escindida antes de la secreción durante el procesamiento intracelular.

Se purificó SLURP-1 etiquetada con polihistidina recombinante mediante una cromatografía de afinidad al cobalto con resina Talon (Clontech). Específicamente, se purificó SLURP-1 recombinante usando la etiqueta His₆ del medio de cultivo de células de mamíferos e insectos transfectadas de manera estable, que fueron cultivadas durante 3 días antes de recolectar el medio. Después de una diálisis contra amortiguador A (fosfato de sodio 50 mM; NaCl 300 mM; pH 7,4), los sobrenadantes fueron incubados con resina Talon (Clontech) y el protocolo del amortiguador nativo provisto. Después de un lavado, la proteína de fusión fue eluida con amortiguador A que contenía imidazol 150 mM. Las fracciones que contenían SLURP-1 fueron bien dializadas contra el amortiguador A o bien cargadas en una columna de cromatografía de filtración en gel BioRad BioPrepSE-100/17 y eluidas con amortiguador A para obtener SLURP-1 pura recombinante.

La Figura 2A muestra la línea celular estable 293T-SLURP-1 generada por la transfección en fosfato de calcio y selección con Zeocina. El medio de cultivo fue recogido después de 72 h. La SLURP-1 etiquetada con His₆ se purificó a partir del medio de cultivo con resina Talon. Se cargaron fracciones en un SDS-PAGE al 15%. Las proteínas fueron reveladas bien por tinción con plata o bien por inmunoblotting con anticuerpo anti-myc. Calle 1, entrada; calle 2, flujo que atraviesa; calle 3, lavado 1; calle 4, lavado 2; calle 5, elución 1; calle 6, elución 2. Los resultados de la Figura 2A muestran que la mayoría de las proteínas no se unieron a la resina, y permanecieron en la fracción del flujo que atraviesa.

La Figura 2B muestra SDS-PAGE (acrilamida al 15%) teñido con plata de SLURP-1 recombinante después de la purificación con resina Talon y cromatografía de exclusión de tamaños. Los resultados de la Figura 2B muestran que las proteínas co-purificadas fueron eliminadas por filtración en gel (BioRad BioPrepSE-100/17) y se obtuvo SLURP-1 pura recombinante. El rendimiento final estimado fue aproximadamente 100 µg de proteína por litro de medio de cultivo.

Ejemplo 2

Dado que la glicosilación de proteínas puede cambiar las propiedades biológicas, y dado que la SLURP-1 contiene un sitio de N-glicosilación putativo en N64, una SLURP-1 parcialmente purificada producida en células de mamíferos e insectos fue incubada con N-glicosidasa F, la cual hidroliza las cadenas de N-glicano. Específicamente, aproximadamente 10 mg de SLURP-1 etiquetada con myc-His₆, parcialmente purificada a partir un medio de cultivo de células de insectos o bien de mamíferos, se diluyeron en una disolución de fosfato de sodio 25 mM (pH 7,0), EDTA 25 mM, y SDS al 0,15% y después se calentó a 100°C durante 5 min. Después de haberse enfriado la disolución, se añadió Nonidet P-40 al 10% y N-glicosidasa F 0,6U (Roche) (concentraciones finales de detergente, 0,1% de SDS y 0,5% de Nonidet P-40) y la mezcla se incubó a 37°C durante 20 h. La reacción fue detenida añadiendo amortiguador de muestras SDS-PAGE, seguido de una incubación a 100° C durante 5 min. Después, las muestras se cargaron en SDS-PAGE al 15% y se revelaron con tinción de plata o análisis western blot con anticuerpo anti-myc, usando proteínas co-purificadas como control positivo interno para la actividad de la N-glicosidasa F. El desplazamiento en la migración de algunas de estas proteínas co-purificadas indicó el funcionamiento apropiado de la enzima. La flecha en la Figura 1C indica que no estaban presentes proteínas desglucosiladas co-purificadas antes del tratamiento con N-glicosidasa. Los resultados en la Figura 1C muestran que

el tratamiento con N-glicosidasa no modificó la migración de la SLURP-1, indicando que la SLURP-1 no está glicosilada.

Ejemplo 3

Como la SLURP-1 es un miembro de las familias Ly-6/ α Bgtx, se realizaron estudios de análisis estructural para determinar la similitud de la SLURP-1 a otras proteínas. La Figura 3A muestra un árbol filogenético de las familias Ly-6/ α Bgtx que indica la relación entre toxinas secretadas por serpientes y la familia Ly-6/uPAR anclada con GPI. El cálculo del árbol filogenético se basa en un método de distancia de secuencias y utiliza el algoritmo de unión vecinal (véase Saitou y Nei, Mol. Biol. Evol., 4, 406-425 (1987)). La Figura 4 muestra la comparación de constitución de dominio entre miembros de la familia Ly-6/uPAR y toxinas de venenos de serpiente. Todas las proteínas de la familia comparten el mismo dominio de consenso. uPAR comparte la misma estructura pero contiene también tres dominios Ly-6/uPAR contiguos. La secuencia señal de anclaje a GPI indica un sitio de escisión después de la adición del resto GPI. Los datos en la Figura 3A y en la Figura 4 muestran que el análisis filogenético basado en la secuencia de aminoácidos de la SLURP-1 revela una estrecha relación con la subfamilia de citotoxinas de serpiente y rana de dominio único, es decir, α -bungarotoxina. Los datos muestran además que la SLURP-1 está filogenéticamente más estrechamente relacionada con las toxinas de serpiente que con los receptores anclados a GPI de los mamíferos.

Para analizar adicionalmente la estructura de la SLURP-1, se generó un modelo tridimensional. Específicamente, se construyó un modelo tridimensional de la SLURP-1 mediante el programa de ordenador 3D-PSSM (véase Kelley et al., J. Mol. Biol., 299, 499-520 (2000)). El 3D-PSSM (matriz de puntuación específica a la posición tridimensional) usa alineaciones estructurales de proteínas homólogas de estructura tridimensional similar en la base de datos de la clasificación estructural de las proteínas (SCOP) para obtener una equivalencia estructural de residuos. Estas equivalencias se usan para extender secuencias alineadas múltiples obtenidas por investigaciones estándar de secuencias. La gran alineación múltiple basada en la superfamilia resultante es convertida en un PSSM. Combinado con el emparejamiento de estructuras secundarias y potenciales de solvatación, el 3D-PSSM puede reconocer relaciones estructurales y funcionales entre proteínas homólogas (véase Kelley et al., J. Mol. Biol., 299, 499-520 (2000)). La Figura 3B muestra la comparación del modelo de la SLURP-1 (izquierda) y la estructura por RMN experimental del dominio extracelular CD59 (derecha, código PDB: 1ERG). Las cisteínas de la SLURP-1 están coloreadas de amarillo, como los puentes disulfuro del dominio extracelular CD59. Los datos indican la disposición homóloga de los puentes disulfuro del CD59 y las cisteínas de la SLURP-1. Ambas proteínas adoptan estructuralmente, o se predice que adoptan, la característica apariencia de tres dedos de las proteínas de serpiente. Los extremos N- y C-terminales de las moléculas están marcados. El análisis de la estructura tridimensional de la SLURP-1 en la Figura 3B muestra que la SLURP-1 se asemeja a la estructura tridimensional de otras proteínas Ly-6 y toxinas de veneno de rana y serpiente con forma de tres dedos, es decir, CD59 y α -bungarotoxina.

Ejemplo 4

Se realizó un estudio para determinar si la SLURP-1 interactúa con los receptores de acetilcolina nicotínicos y es funcionalmente homóloga a las toxinas de venenos. En el estudio, se examinaron respuestas de corriente macroscópicas provocadas por acetilcolina en oocitos de *Xenopus* de control y tratados con SLURP-1 que expresan receptores de acetilcolina nicotínicos $\alpha 7$ humanos recombinantes.

Específicamente, se aislaron y prepararon oocitos de *X. laevis* como se describió previamente (véase Bertrand et al., In: Methods in Neuroscience, Conn, M. (ed.). Academic Press, New York, Vol. 4, págs. 174-193 (1991)). Los oocitos fueron inyectados intranuclearmente con 2 ng de ADNc $\alpha 7$ humano y fueron mantenidos en pocillos independientes de una placa de microvaloración de 96 pocillos a 18°C. El medio de control OR2 consistió en NaCl 88 mM, KCl 2,5 mM, HEPES 10 mM, MgCl₂ 1 mM y CaCl₂ 2 mM, pH 7,4, ajustado con NaOH. Se llevaron a cabo experimentos de electrofisiología 2-4 días después de la inyección de ADNc. Los registros electrofisiológicos se realizaron usando un amplificador de pinzamiento de voltaje de dos electrodos (GeneClamp; Axon Instruments, Union City, CA, USA); el potencial basal fue -100mV. Los electrodos estaban hechos de vidrio de borosilicato y contenían KCl 3 M. Se realizaron intercambios de disoluciones mediante un sistema automatizado basado en un robot manipulador de líquidos. Los oocitos fueron continuamente perfundidos con OR2 excepto durante la incubación del péptido. Los oocitos fueron mantenidos a 18°C durante los experimentos. Las curvas dosis-respuesta se ajustaron mediante la ecuación $y = I_{max} * \{1 / (1 + (EC_{50} / [Ach])^n)\}$, donde I_{max} es la amplitud de corriente normalizada máxima, EC₅₀ la concentración de agonista de eficacia media, n el coeficiente de Hill y [Ach] la concentración de acetilcolina.

Las respuestas provocadas por acetilcolina se midieron antes y después de la exposición (2,5-5 min) a SLURP-1 altamente purificada. La SLURP-1 aumentó la amplitud de las corrientes macroscópicas provocadas por acetilcolina de una manera dependiente de la concentración. La Figura 5A muestra respuestas de corriente antes y después de 5 min de exposición a SLURP-1 20 nM. Las corrientes fueron activadas por una aplicación de 2 s de acetilcolina 100 mM. Los resultados de la Figura 5A muestran que a una concentración de 200 pM, la SLURP-1 aumentó la amplitud de las corrientes macroscópicas provocadas por acetilcolina en un 421±130% ($n=6$), y la SLURP-1 a 20 nM aumentó la amplitud en un 1214±550% ($n=4$), comparado con el control. Como se muestra en la Figura 5B, la curva dosis-respuesta indica que la SLURP-1 potencia homopentámeros de los receptores de acetilcolina nicotínicos $\alpha 7$, dado

que la EC_{50} fue 175 μ M de acetilcolina para los controles y cayó a 68 μ M de acetilcolina después del tratamiento con SLURP-1. La Figura 5C muestra que la SLURP-1 a 200 pM desplazó la curva dosis-respuesta de la acetilcolina (cuadrados cerrados) a la izquierda, y aumentó la E_{max} (círculos sólidos). La EC_{50} fue 178 μ M para el control y 68 μ M después de 2,5 min de exposición a la SLURP-1 (200 pM). $n = 6$ para cada punto de datos. Los efectos de la SLURP-1 sobre la curva dosis-respuesta de Acetilcolina indican que una concentración de 200 pM causa un aumento tanto en la amplitud de la corriente como en la sensibilidad a la Acetilcolina, así como un aumento en el coeficiente de Hill. La aplicación de SLURP-1 no provocó corrientes en ausencia de Acetilcolina. >Por tanto, la SLURP-1 funciona no como ligando o neurotransmisor, sino que modula la función del receptor en presencia de su ligando natural de una manera consistente con un modo de acción alostérico.

Ejemplo 5

Para caracterizar adicionalmente la electrofisiología de la actividad de la SLURP-1 sobre los receptores de acetilcolina e identificar el sitio de interacción, se construyen subunidades quiméricas a partir de $\alpha 7$ y subunidades que no son potenciadas por la SLURP-1 y los expresan en oocitos de *X. laevis*. Los residuos de aminoácidos específicos implicados en la acción de la SLURP-1 se identifican usando subunidades $\alpha 7$ que contienen mutaciones de punto único. Los estudios electrofisiológicos se extienden a queratinocitos en cultivo y otros tipos de células que expresan el receptor de acetilcolina diana de la SLURP-1. El impacto de la SLURP-1 sobre la diferenciación de los queratinocitos se estudia en cultivos de piel organotípicos.

La interacción de la SLURP-1 con los receptores de acetilcolina se caracteriza a nivel molecular. Los efectos de las proteínas SLURP-1 mutadas se comparan con los de SLURP-1 nativa sobre receptores de acetilcolina homoméricos y heteroméricos. La identificación de residuos esenciales para la interacción de la SLURP-1 con su(s) diana(s) facilita el diseño de moléculas bien imitando o bien antagonizando el efecto de la SLURP-1, dado que la interacción de toxinas con forma de tres dedos con su diana implica a menudo sólo unos pocos aminoácidos, bien agrupados o bien extendidos a lo largo de la estructura primaria de las proteínas (véase Kini, Clin Exp Pharmacol Physiol 29(9): 815-22 (2002)).

Para determinar la localización *in situ* de la SLURP-1 y sus transcriptos, se llevan a cabo estudios de hibridación *in situ* sobre biopsias humanas usando anticuerpos anti-SLURP-1. Se pueden generar anticuerpos anti-SLURP-1 monoclonales y policlonales para dominios específicos (es decir, dominio interno) de la SLURP-1 para estos y adicionales estudios. Estos estudios complementarán los estudios inmunohistoquímicos que localizan la SLURP-1 en diversos epitelios (véase Mastrangeli y Donini, Eur J Dermatol 13(6): 560-70 (2003)). Estos estudios identificarán la expresión alterada de SLURP-1 en ciertas patologías, p.ej., trastornos dermatológicos.

Para determinar la eficacia de la SLURP-1 sobre la expresión de genes *in vivo*, se someten biopsias humanas y ratones transgénicos de SLURP-1 a un análisis de micromatrices. La expresión de SLURP-1 en estos ratones transgénicos está bajo el control del promotor de la queratina 14 (expresión de la capa basal). Estos estudios permiten la identificación de los efectos fisiológicos exactos de la SLURP-1 *in vivo*.

Ejemplo 6

Para determinar la actividad de otros miembros secretados de la familia Ly-6/uPAR (Isoforma A de Lynx-1, Isoforma B de Lynx-1 y RGTR-430), se generan proteínas recombinantes de miembros de la familia Ly-6/uPAR que expresan etiquetas c-myc y His₆ como se describió (véase el Ejemplo 1, más arriba, y Chimineti et al., Hum Mol Genet 12(22): 3017-24 (2003)). Estas proteínas recombinantes de miembros de la familia Ly-6/uPAR se purifican hasta la homogeneidad aparente en dos etapas por cromatografía de afinidad por metales inmovilizados y filtración en gel como se describió (véase el Ejemplo 1, más arriba; Chimineti et al., Hum Mol Genet 12(22): 3017-24 (2003); Ibanez et al., Neuron 33(6): 893-903 (2002)). Además, se generan anticuerpos monoclonales y policlonales a proteínas miembros de la familia Ly-6/uPAR secretadas específicas. Estos anticuerpos se pueden generar para dominios específicos. Alternativamente, dado que la homología entre proteínas miembros de la familia Ly-6/uPAR secretadas es baja, se pueden inmunizar conejos con proteínas completas o proteínas de fusión con GST.

Se han analizado diversos tejidos para determinar la expresión de genes que codifican los miembros de la familia Ly-6/uPAR secretados usando RT-PCR. Los estudios muestran que los transcriptos para SLURP-1, RGTR-430 e Isoforma B de Lynx-1 están altamente expresados en la epidermis y en los queratinocitos humanos normales en cultivo; mientras que la expresión del transcripto 3 de Lynx-1, que codifica para la Isoforma C anclada a GPI, está mucho más ubicuamente expresada. Además, los efectos de las proteínas miembros de la familia Ly-6/uPAR secretadas se pueden evaluar en canales iónicos cerrados por ligando expresados en oocitos de *X. laevis* para identificar su acción sobre la actividad de los receptores de acetilcolina como se describió (véase el Ejemplo 4, más arriba; Chimineti et al., Hum Mol Genet 12(22): 3017-24 (2003)).

OTRAS REALIZACIONES

5 Aunque la invención ha sido descrita junto con la descripción detallada de la misma, la siguiente descripción pretende ilustrar y no limitar el alcance de la invención, la cual es definida por el alcance de las reivindicaciones adjuntas.

LISTA DE SECUENCIAS

- 10 <110> Universidad de Lausana
Universidad de Ginebra
- <120> SLURP-1 Composiciones y Métodos de uso de la misma
- 15 <130> 20349-564-061
- <140> No asignado aún
<141> 2004-04-16
- 20 <150> 60/463,418
<151> 2003-04-16
- <160> 6
- 25 <170> PatentIn Ver. 2.1
- <210> 1
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
- 30 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial:Secuencia del dominio consenso
- 35 <220>
<221> VARIANTE
<222> (3)..(6)
<223> En donde Xaa es cualquier aminoácido. <400> 1
- Cys Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Asn
1 5
- 40 <210> 2
<211> 103
<212> PRT
<213> Homo sapiens
- 45 <400> 2

ES 2 359 408 T3

Met Ala Ser Arg Trp Ala Val Gln Leu Leu Leu Val Ala Ala Trp Ser
 1 5 10 15
 Met Gly Cys Gly Glu Ala Leu Lys Cys Tyr Thr Cys Lys Glu Pro Met
 20 25 30
 Thr Ser Ala Ser Cys Arg Thr Ile Thr Arg Cys Lys Pro Glu Asp Thr
 35 40 45
 Ala Cys Met Thr Thr Leu Val Thr Val Glu Ala Glu Tyr Pro Phe Asn
 50 55 60
 Gln Ser Pro Val Val Thr Arg Ser Cys Ser Ser Ser Cys Val Ala Thr
 65 70 75 80
 Asp Pro Asp Ser Ile Gly Ala Ala His Leu Ile Phe Cys Cys Phe Arg
 85 90 95
 Asp Leu Cys Asn Ser Glu Leu
 100

- 5 <210> 3
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
- <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Secuencia del cebador
- 10 <400> 3
 aagcttgag caatggcctc tcgctgg 27
- <210> 4
 <211> 27
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
- <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Secuencia del cebador
- 20 <400> 4
 tctagagagt tccgagttgc agaggtc 27
- <210> 5
 <211> 20
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
- <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Secuencia del cebador
- 30 <400> 5
 gagatatcgg agcaatggcc 20
- <210> 6
 <211> 30
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
- <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Secuencia del cebador
- <400> 6
 45 agagatcctc acagatcctc ttctgagatg 30

REIVINDICACIONES

- 5 1. Composición que comprende una cantidad eficaz de SLURP-1 para el uso en el tratamiento de un trastorno neurológico en un paciente.
2. Composición que comprende una cantidad eficaz de SLURP-1 para el uso para prevenir o retrasar el comienzo de un trastorno neurológico en un paciente.
- 10 3. Composición que comprende una cantidad eficaz de SLURP-1 para el uso para la neuroprotección de un paciente.
- 15 4. La composición para el uso según las reivindicaciones 1-3, en donde el trastorno neurológico se selecciona del grupo que consiste en dolor, dolor neuropático, esquizofrenia, daños cognitivos, enfermedad de Alzheimer y enfermedad de Parkinson.
- 20 5. Composición que comprende una cantidad eficaz de SLURP-1 para el uso en el tratamiento de una patología de la piel.
6. Composición que comprende una cantidad eficaz de SLURP-1 para el uso para prevenir o retrasar el comienzo de una patología de la piel.
- 25 7. La composición para el uso según las reivindicaciones 5 ó 6, en donde la patología de la piel se selecciona del grupo que consiste en Mal de Meleda, cicatrización y psoriasis.
- 30 8. La composición para el uso según la reivindicación 7, en donde dicha patología de la piel está causada por la disfunción de un receptor de acetilcolina expresado en la piel.
9. La composición para el uso según la reivindicación 4, en donde dicho trastorno neurológico está causado por la disfunción de un receptor de acetilcolina.
- 35 10. La composición para el uso según las reivindicaciones 8 ó 9, en donde la composición modula la actividad de un receptor de acetilcolina.
11. La composición para el uso según las reivindicaciones 8-10, en donde el receptor de acetilcolina es un receptor de acetilcolina nicotínico.
- 40 12. La composición para el uso según la reivindicación 11, en donde el receptor de acetilcolina nicotínico se selecciona del grupo que consiste en un receptor de acetilcolina nicotínico alfa 7 y una proteína relacionada con el receptor de acetilcolina nicotínico alfa 7.
- 45 13. La composición para el uso según las reivindicaciones 1-7, en la que la cantidad eficaz de SLURP-1 es de aproximadamente 1,0 pM a aproximadamente 10 µM.
14. La composición para el uso según las reivindicaciones 1-7, en la que la cantidad eficaz de SLURP-1 es para la administración al paciente por un método seleccionado del grupo que consiste en vía oral, intravenosa, intraperitoneal, intranasal e intramuscular.
- 50 15. La composición para el uso según las reivindicaciones 1-7, en la que el compuesto comprende además un vector de expresión capaz de expresar la proteína SLURP-1 en un paciente.
- 55 16. La composición para el uso según las reivindicaciones 1-7, en la que la SLURP-1 está en una forma madura.
17. La composición para el uso según la reivindicación 16, en la que la forma madura de SLURP-1 comprende los aminoácidos 23-103 de la SLURP-1.
- 60 18. La composición para el uso según las reivindicaciones 1-7, en donde el paciente es un mamífero.
19. La composición para el uso según la reivindicación 18, en donde el mamífero es un ser humano.
20. La composición para el uso según la reivindicación 10, en donde dicha modulación del receptor de acetilcolina restablece la función apropiada del receptor de acetilcolina.

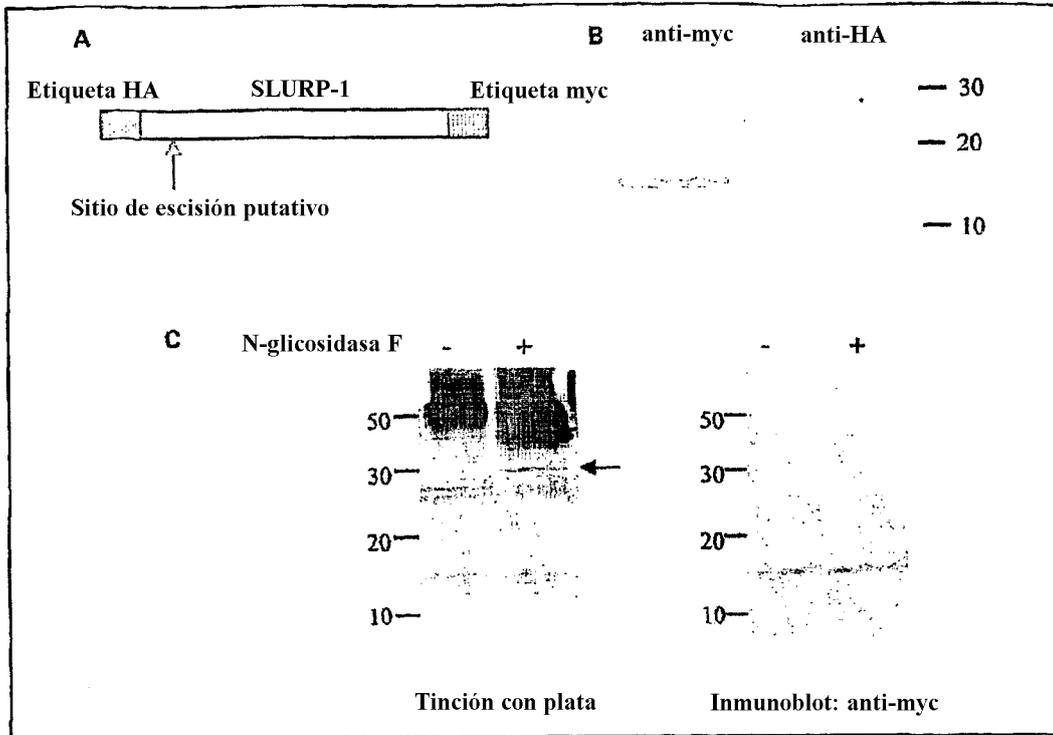


FIGURA 1

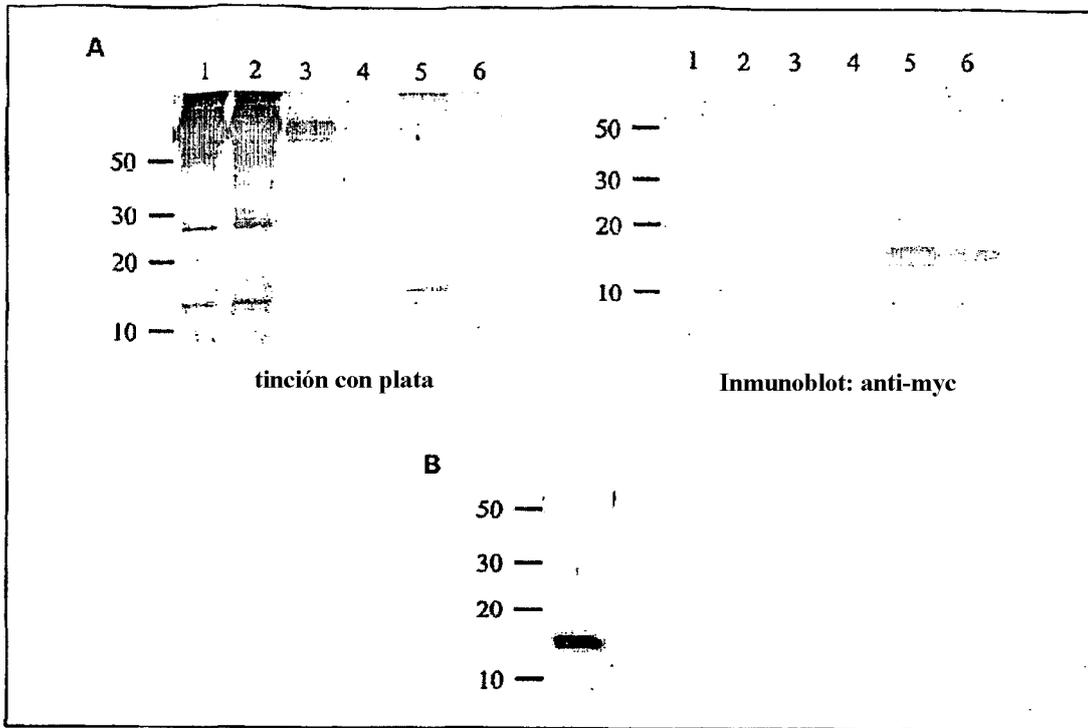


FIGURA 2

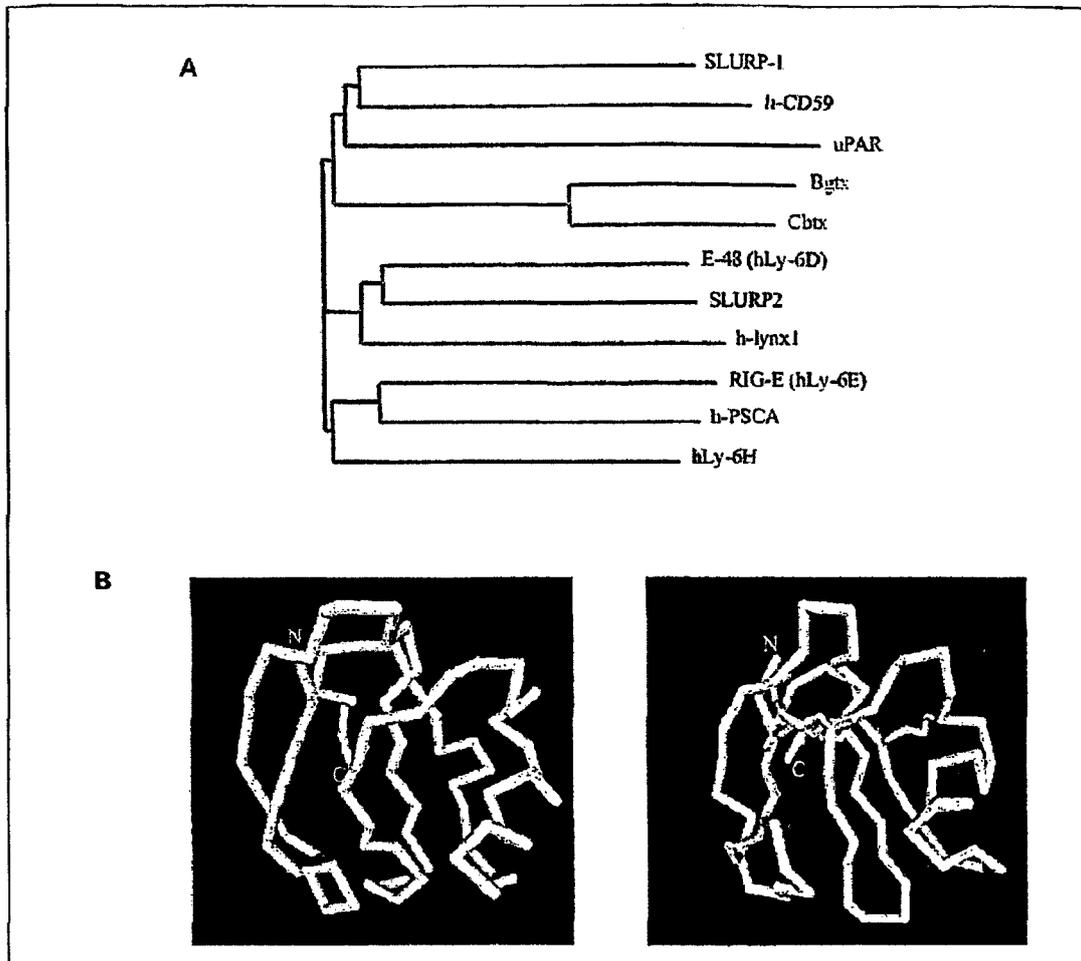


FIGURA 3

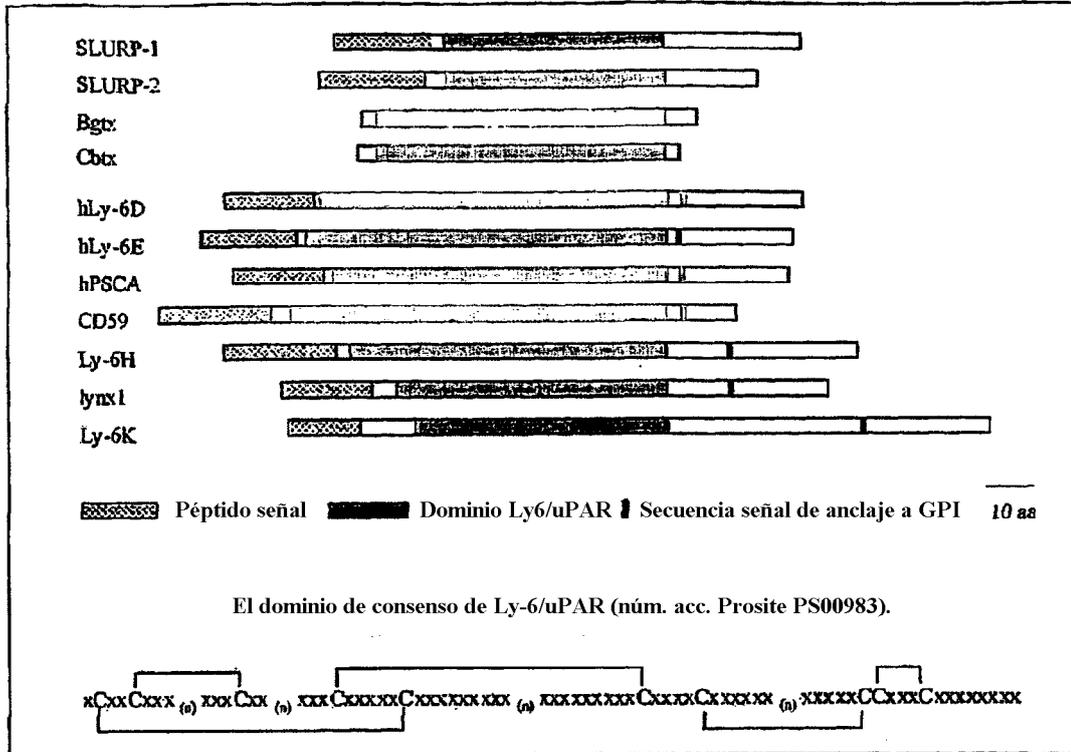


FIGURA 4

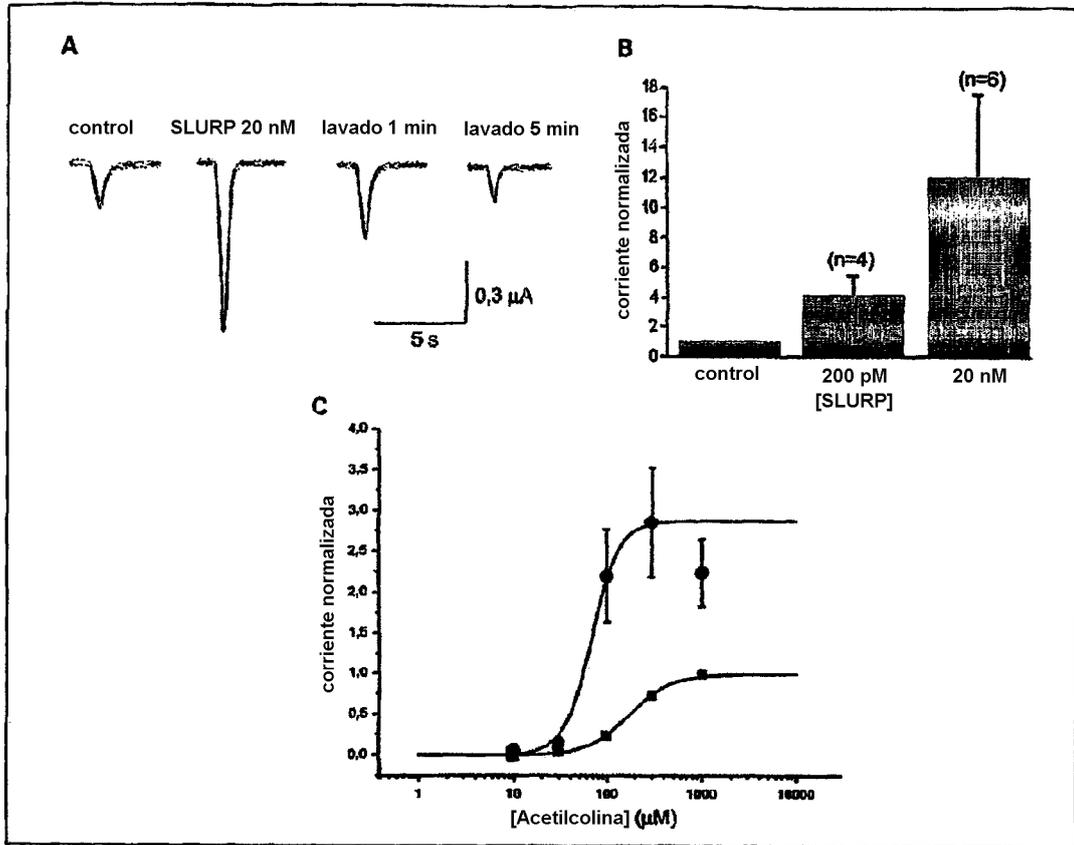


FIGURA 5