

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 386 838**

51 Int. Cl.:  
**A61K 47/48** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **00962721 .7**  
96 Fecha de presentación: **25.09.2000**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1235594**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **04.09.2002**

54 Título: **Inhibición de la secreción a partir de células no neuronales**

30 Prioridad:  
**23.09.1999 GB 9922554**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**03.09.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**03.09.2012**

73 Titular/es:  
**SYNTAXIN LIMITED  
UNITS 4-10 THE QUADRANT BARTON LANE  
ABINGDON OXFORDSHIRE OX14 3YS, GB**

72 Inventor/es:  
**FOSTER, Keith Alan;  
CHADDOCK, John A.;  
PURKISS, John R. y  
QUINN, Conrad, Padraig**

74 Agente/Representante:  
**Ponti Sales, Adelaida**

ES 2 386 838 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

Inhibición de la secreción a partir de células no neuronales

- 5 **[0001]** La presente invención se refiere a usos para el tratamiento de enfermedades mediante la inhibición de la secreción a partir de células inflamatorias no neuronales, y a sus agentes. La presente invención se refiere al tratamiento de enfermedades que dependen de la actividad citotóxica de células inflamatorias.
- [0002]** La exocitosis es la fusión de vesículas secretoras con la membrana plasmática y da como resultado la  
10 descarga del contenido de las vesículas : un proceso también conocido como secreción celular. La exocitosis puede ser constitutiva o regulada. Se cree que la exocitosis constitutiva se produce en todos los tipos celulares mientras que la exocitosis regulada ocurre en células especializadas.
- [0003]** La comprensión de los mecanismos involucrados en la exocitosis ha aumentado rápidamente, después de  
15 la propuesta de la hipótesis SNARE (Rothman, 1994, Nature 372, 55 – 63) . Esta hipótesis describe marcadores proteicos sobre las vesículas, que reconocen marcadores diana de membrana. Estos denominados SNARES cognados (denotados v-SNARE para las vesículas y t-SNARE para las dianas) facilitan el acoplamiento y la fusión de las vesículas con las membranas correctas, dirigiendo así la descarga de los contenidos vesiculares en el compartimiento apropiado. Para la comprensión de este proceso ha sido clave la identificación de las proteínas involucradas. Para la exocitosis se han identificado tres familias de proteínas SNARE : SNAP-25 y SNAP-23, y las  
20 syntaxinas son las familias t-SNARE sobre la membrana; y las VAMP (proteína de membrana asociada a vesículas) , que incluyen la sinaptobrevina y la celubrevina, son la familia v-SNARE sobre vesículas secretoras. Componentes clave de la maquinaria de fusión que incluyen las SNARE están involucrados tanto en la exocitosis regulada como constitutiva (De Camilli, 1993, Nature, 364, 387 – 388) .
- 25 **[0004]** Las neurotoxinas clostridiales son proteínas con pesos moleculares del orden de los 150 kDa. Son producidas por diversas especies del género *Clostridium*, principalmente *C. tetani* y varias cepas de *C. botulinum*. Actualmente existen ocho clases diferentes de neurotoxinas conocidas : la toxina del tétano y la neurotoxina botulínica en sus serotipos A, B, C<sub>1</sub>, D, E, F y G, y todas ellas comparten estructuras y modos de acción similares.  
30 Las neurotoxinas clostridiales son sintetizadas por las bacterias en forma de un único polipéptido que se modifica post-traduccionalmente para formar dos cadenas polipeptídicas unidas por un enlace disulfuro. Las dos cadenas se denominan cadena pesada (H) que tiene un peso molecular de aproximadamente 100 kDa y cadena ligera (LC) que tiene un peso molecular de aproximadamente 50 kDa. Las neurotoxinas clostridiales son altamente selectivas para las células neuronales, y se unen a ellas con una elevada afinidad [véase Black, J.D. y Dolly, J.O. (1987) Selective  
35 location of acceptors for BoNT/A in the central and peripheral nervous systems. Neuroscience, 23, pp. 767 – 779; Habermann, E. y Dreyer, F. (1986) Clostridial neurotoxins : handling and action at the cellular and molecular level. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 129, pp. 93 – 179; y Sugiyama, H. (1980) *Clostridium botulinum* neurotoxin. Microbiol. Rev., 44, pp. 419 – 448 (y las referencias allí citadas) ].
- 40 **[0005]** Los requerimientos funcionales para la neurointoxicación por parte de las neurotoxinas clostridiales se pueden asignar a dominios específicos dentro de la estructura de la neurotoxina. Las neurotoxinas clostridiales se unen a un sitio aceptor sobre la membrana celular de la neurona motora en la sinapsis neuromuscular y, después de unirse al receptor altamente específico, son internalizadas mediante un mecanismo endocitótico. Se sabe que la actividad de unión específica de la sinapsis neuromuscular de las neurotoxinas clostridiales reside en el extremo  
45 carboxi-terminal del componente de la cadena pesada de la molécula bicatenaria de la neurotoxina, una región conocida como H<sub>C</sub>. Las neurotoxinas clostridiales internalizadas poseen una actividad endopeptidasa dependiente de cinc altamente específica que hidroliza un enlace peptídico específico en al menos una de las tres familias de proteínas, la sinaptobrevina, la syntaxina o la SNAP-25, que son componentes cruciales de la maquinaria neurosecretora. Se ha encontrado que la actividad endopeptidasa dependiente de cinc de las neurotoxinas clostridiales reside en la cadena ligera (LC) . La fracción amino-terminal del componente de la cadena pesada de la molécula bicatenaria de la neurotoxina, una región conocida como H<sub>N</sub>, es responsable de la translocación de la neurotoxina, o de una parte de ella que contiene la actividad endopeptidasa, a través de la membrana endosómica después de la internalización, permitiendo así el acceso de la endopeptidasa al citosol de la neurona y a su (s)  
50 proteína (s) sustrato. El resultado de la neurointoxicación es la inhibición de la liberación de neurotransmisores desde la neurona diana debido al impedimento de la liberación de los contenidos de la vesícula sináptica.  
55
- [0006]** Aún no se ha caracterizado completamente el mecanismo mediante el cual el dominio H<sub>N</sub> lleva a cabo la translocación de la endopeptidasa hacia el citosol neuronal, pero se cree que implica un cambio conformacional, la inserción en la membrana endosómica y la formación de alguna forma de canal o poro a través del cual la endopeptidasa tiene acceso al citosol neuronal. Después de la unión a su receptor específico en la superficie neuronal, existen evidencias farmacológicas y morfológicas que indican que las neurotoxinas clostridiales entran en la célula por endocitosis [Black & Dolly (1986) J. Cell Biol. 103, 535 – 44] y a continuación deben pasar por una

etapa a pH bajo para que se produzca la intoxicación de la neurona [Simpson y col. (1994) *J. Pharmacol Exp. Ther.*, 269, 256 – 62]. El pH ácido no activa directamente la toxina mediante un cambio estructural, pero se cree que desencadena el proceso de la translocación de la membrana de la LC desde el lumen de la vesícula endosómica neuronal al citosol neuronal [Montecucco y col. (1994) *FEBS Lett.* 346, 92 – 98]. Existe un consenso general sobre el hecho de que canales determinados por la toxina están relacionados con el proceso de translocación hacia el citosol [Schiavo & Montecucco (1997) en *Bacterial Toxins* (ed. K. Aktories)]. Este modelo requiere que el dominio H<sub>N</sub> forme un poro hidrófobo transmembrana a través de la membrana ácida de la vesícula que permita el paso de la LC parcialmente desplegada hacia el citosol. Se cree que el cambio conformacional necesario se desencadena por factores medioambientales en el compartimento endosómico neuronal hacia el cual se internaliza la neurotoxina, y una característica necesaria del dominio de unión de la H<sub>C</sub> es dirigir sitios de unión que permite la internalización en el compartimento endosómico adecuado. Por tanto, las neurotoxinas clostridiales han evolucionado para dirigir restos de la superficie celular que cumplan este requerimiento.

**[0007]** Las hormonas son mensajeros químicos que son segregadas por las glándulas endocrinas del cuerpo. Ejercen acciones fisiológicas específicas sobre otros órganos a los que son transportados por la sangre. El espectro de procesos regulados por las hormonas incluye diversos aspectos de la homeostasis (por ejemplo, la insulina regula la concentración de glucosa en sangre), el crecimiento (por ejemplo, la hormona del crecimiento promueve el crecimiento y regula el metabolismo de las grasas, carbohidratos y proteínas), y la maduración (por ejemplo, las hormonas sexuales promueven la maduración sexual y la reproducción). La hiperfunción endocrina produce estados patológicos provocados por cantidades excesivas de una hormona u hormonas en el torrente sanguíneo. Las causas de la hiperfunción se clasifican como neoplásicas, autoinmunitarias, iatrogénicas e inflamatorias. Los trastornos de hiperfunción endocrina son un grupo de enfermedades complejas, no solo debido a que existe un gran número de glándulas que pueden provocar una patología (por ejemplo, la pituitaria anterior, la pituitaria posterior, el tiroides, el paratiroides, la corteza adrenal, la médula adrenal, el páncreas, los ovarios, los testículos) sino porque muchas de las glándulas producen más de una hormona (por ejemplo, la pituitaria anterior produce corticotropina, prolactina, hormona luteinizante, hormona estimuladora de los folículos, hormona estimuladora del tiroides y gonadotropinas). La mayoría de trastornos provocados por los excesos hormonales se deben al crecimiento neoplásico de células que producen hormonas. No obstante, ciertos tumores de origen no endocrino pueden sintetizar hormonas provocando síntomas patológicos de hiperfunción endocrina. La producción hormonal en estas condiciones se denomina "ectópica". Habitualmente, el tratamiento elegido es la destrucción inducida por extracción quirúrgica o radiación de parte o todo el tejido hipersecretor. No obstante, estos enfoques no siempre son aplicables, lo que produce una pérdida total de la producción hormonal o la necesidad de repetir el tratamiento debido a un nuevo crecimiento del tejido secretor.

**[0008]** Un nivel de complejidad adicional en los trastornos de hiperfunción endocrina aparece en un grupo de dolencias denominadas neoplasias endocrinas múltiples (MEN) en las que están involucradas dos o más glándulas endocrinas. Los síndromes de neoplasia endocrina múltiple (MEN1 y MEN2) son dolencias familiares con un patrón hereditario autosómico dominante. La MEN1 se caracteriza por la asociación de hiperplasia paratiroidea, tumores endocrinos pancreáticos, y adenomas pituitarios, y tiene una prevalencia de aproximadamente 1 en 10.000. La MEN2 es la asociación de carcinoma de células medulares del tiroides y feocromocitoma, aunque en algunos pacientes también se puede producir hiperplasia paratiroidea.

**[0009]** La mayoría de la morbilidad asociada a la MEN1 se debe a los efectos de tumores endocrinos pancreáticos. A menudo no es posible la cirugía y el objetivo terapéutico es reducir el exceso de hormonas. Además de reducir la masa tumoral, que no siempre es posible, la vía de acción preferida es la inhibición de la secreción hormonal. Los procedimientos actuales incluyen la aplicación subcutánea del análogo de somatostatina, el octreótido. No obstante, este enfoque solo tiene una eficacia temporal, y su éxito disminuye a los pocos meses.

**[0010]** Se conocen muchos otros estados patológicos que suponen la secreción a partir de otras células no neuronales no endocrinas. Por consiguiente sería deseable tratar, reducir o evitar la secreción por parte de células no neuronales, tales como la hiperfunción de las células endocrinas que provocan o dan lugar a estas enfermedades.

**[0011]** La actividad de las neurotoxinas botulínicas está exclusivamente restringida a la inhibición de la liberación de neurotransmisores procedentes de las neuronas. Esto se debe a la expresión exclusiva de sitios de unión de alta afinidad para las neurotoxinas clostridiales sobre células neuronales [véase Daniels-Holgate, P.U. y Dolly, J.O. (1996) Productive and non-productive binding of botulinum neurotoxin to motor nerve endings are distinguished by its heavy chain. *J. Neurosci. Res.* 44, 263 – 271].

**[0012]** Las células no neuronales no poseen los sitios de unión de alta afinidad para neurotoxinas clostridiales, y por tanto son refractarias a los efectos inhibidores de la neurotoxina aplicada de forma exógena. La sola aplicación de neurotoxinas clostridiales a la superficie de células neuronales por tanto no da lugar a la inhibición de la

exocitosis de vesículas secretoras.

**[0013]** Por consiguiente, la unión productiva o falta de unión productiva de neurotoxinas clostridiales define así a las células neuronales y células no neuronales, respectivamente.

5

**[0014]** Además de carecer de sitios de unión de alta afinidad para neurotoxinas clostridiales, la ausencia del mecanismo correcto de internalización y direccionamiento intracelular, o factores adicionales que aún no se comprenden, impediría la acción de la neurotoxina clostridial en células no neuronales.

10 **[0015]** Por el documento WO 96/33273 se sabe que se pueden preparar híbridos de endopeptidasas y neurotoxinas clostridiales, y que estos híbridos inhiben eficazmente la liberación de neurotransmisores procedentes de células neuronales a los cuales están dirigidas, tales como las neuronas transmisoras del dolor. El documento WO 96/33273 describe la actividad de híbridos solo en sistemas neuronales en los que están operativos los mecanismos neuronales de internalización y direccionamiento vesicular.

15

**[0016]** No obstante, las células no neuronales son refractarias a los efectos de las neurotoxinas clostridiales, puesto que la sola aplicación de neurotoxinas clostridiales a la superficie de células no neuronales no da lugar a la inhibición de la exocitosis de vesículas secretoras. Esta falta de sensibilidad de las células no neuronales a las neurotoxinas clostridiales puede deberse a la ausencia del receptor necesario, a la ausencia del mecanismo correcto de internalización y direccionamiento intracelular, o a factores adicionales que aún no se comprenden.

20

**[0017]** El documento WO 95/17904 describe el uso de la holotoxina de *C. botulinum* en el tratamiento de diversos trastornos tales como sudoración, lacrimación y secreción de moco excesivas, y dolor. El documento WO 95/17904 describe el tratamiento con el direccionamiento de células neuronales.

25

**[0018]** Es un objeto de la presente invención proporcionar usos y agentes para la inhibición de la secreción a partir de células inflamatorias no neuronales.

30 **[0019]** El documento WO 00/10598, publicado en el intervalo de prioridad, describe el tratamiento de la hipersecreción de moco. Los estados patológicos específicos provocados o exacerbados por la hipersecreción de moco están localizados en las vías aéreas, y se pueden tratar mediante la administración tópica en las vías aéreas o en una región seleccionada o en una porción seleccionada de las vías aéreas. La presente invención excluye esa invención previa.

35 **[0020]** Por consiguiente, la presente invención se basa en el uso de un agente que inhiba la maquinaria exocitótica en células neuronales y que sorprendentemente se ha encontrado que es eficaz inhibiendo procesos exocitóticos en células inflamatorias no neuronales.

40 **[0021]** Así, un primer aspecto de la invención proporciona el uso de un agente para la fabricación de un medicamento para inhibir la secreción a partir de una célula inflamatoria no neuronal, dicho agente que comprende al menos un primer y un segundo dominios, en donde el primer dominio escinde una o más proteínas esenciales para la exocitosis y el segundo dominio produce la translocación del primer dominio hacia la célula inflamatoria.

45 **[0022]** De forma ventajosa, la invención prevé la inhibición de la secreción a partir de células inflamatorias no neuronales, y permite el tratamiento de la enfermedad causada, exacerbada o mantenida por dicha secreción.

50 **[0023]** Un agente para su uso en la invención se prepara de manera conveniente mediante la sustitución del dominio H<sub>C</sub> de unión a la célula de una neurotoxina clostridial con un ligando capaz de unirse a la superficie de células no neuronales. De manera sorprendente, este agente es capaz de inhibir la exocitosis de una variedad de sustancias secretadas procedentes de células inflamatorias no neuronales. Con la unión covalente de una neurotoxina clostridial, o de un híbrido de dos neurotoxinas clostridiales, en el que se ha eliminado o modificado la región H<sub>C</sub> de la cadena H, a una nueva molécula o resto, la fracción de inserción dirigida (TM), se produce un agente que se une a un sitio de unión (BS) sobre la superficie de las células secretoras no neuronales pertinentes. Un aspecto sorprendente adicional de la presente invención es que si la cadena L de una neurotoxina clostridial, o un fragmento, variante o derivado de la cadena L que contiene la actividad endopeptidasa, está unida covalentemente a una TM que también puede llevar a cabo la internalización de la cadena L, o de un fragmento de la actividad endopeptidasa, hacia el citoplasma de una célula secretora inflamatoria no neuronal, esto también produce un agente capaz de inhibir la secreción. Así, la presente invención supera la falta de susceptibilidad de las células inflamatorias no neuronales a los efectos inhibitorios de las neurotoxinas clostridiales.

60

**[0024]** Un ejemplo de un agente para su utilización en la invención es un polipéptido que comprende un primer y un segundo dominios, en donde dicho primer dominio escinde una o más proteínas asociadas a vesículas o a la

membrana plasmática esenciales para la exocitosis neuronal y en donde dicho segundo dominio produce la translocación del polipéptido hacia la célula o produce la translocación de al menos aquella porción responsable de la inhibición de la exocitosis en la célula inflamatoria no neuronal. El polipéptido puede proceder de una neurotoxina, en cuyo caso el polipéptido normalmente está exento de neurotoxina clostridial y de cualquier precursor de la neurotoxina clostridial que se pueda convertir en toxina mediante acción proteolítica, siendo por tanto sustancialmente no tóxico y adecuado para uso terapéutico. Por consiguiente, la invención puede utilizar polipéptidos que contengan un dominio equivalente a una cadena ligera de la toxina clostridial y un dominio que proporcione la función de translocación de la H<sub>N</sub> de una cadena pesada de la toxina clostridial, mientras carece de los aspectos funcionales de un dominio H<sub>C</sub> de la toxina clostridial.

10

**[0025]** En la utilización de la invención, el polipéptido sirve para la administración *in vivo* a un paciente, en donde se produce la translocación del primer dominio hacia una célula inflamatoria no neuronal mediante la acción del segundo dominio y escinde una o más proteínas asociadas a vesículas o a la membrana plasmática esenciales para el proceso celular específico de exocitosis, y la escisión de estas proteínas da como resultado la inhibición de la exocitosis, produciendo así la inhibición de la secreción, normalmente de manera no citotóxica.

15

**[0026]** El polipéptido de la invención se puede obtener mediante la expresión de un ácido nucleico recombinante, preferentemente un ADN, y puede ser un polipéptido sencillo, es decir, no escindido en dominios separados de la cadena ligera y pesada, o dos polipéptidos unidos, por ejemplo, mediante un puente disulfuro.

20

**[0027]** El primer dominio preferentemente comprende una cadena ligera de la toxina clostridial o un fragmento o variante funcional de una cadena ligera de la toxina clostridial. El fragmento es opcionalmente un fragmento N-terminal o C-terminal de la cadena ligera, o es un fragmento interno, siempre que retenga sustancialmente la capacidad para escindir la proteína asociada a vesículas o a la membrana plasmática esencial para la exocitosis.

25

Los dominios mínimos necesarios para la actividad de la cadena ligera de toxinas clostridiales se describen en J. Biol. Chem., Vol. 267, No. 21, julio de 1992, págs. 14721 – 14729. La variante presenta una secuencia peptídica diferente de la cadena ligera o del fragmento, a pesar de que también es capaz de escindir la proteína asociada a vesículas o a la membrana plasmática. De manera conveniente se obtiene mediante inserción, eliminación y/o sustitución de una cadena ligera o uno de sus fragmentos. Son posibles una variedad de variantes, incluyendo (i) una extensión N-terminal a una cadena ligera de la toxina clostridial o un fragmento, (ii) una cadena ligera de la toxina clostridial o un fragmento modificado por la alteración de al menos un aminoácido, (iii) una extensión C-terminal a una cadena ligera de la toxina clostridial o un fragmento, o (iv) combinaciones de dos o más de (i) – (iii).

30

En formas de realización adicionales de la invención, la variante contiene una secuencia de aminoácidos modificada de manera que (a) no exista una región sensible a proteasas entre los componentes LC y H<sub>N</sub> del polipéptido, o (b) la región sensible a proteasas sea específica para una proteasa particular. Si se desea activar la actividad endopeptidasa de la cadena ligera en un entorno o célula particular se debe utilizar esta última forma de realización, a pesar de que, en general, los polipéptidos de la invención se encuentran en forma activa antes de la administración.

35

**[0028]** El primer dominio preferentemente presenta actividad endopeptidasa específica para un sustrato seleccionado entre una o más de SNAP-25, sinaptobrevina/VAMP y syntaxina. La toxina clostridial a partir de la cual se puede obtener o de la que puede proceder este dominio preferentemente es la toxina botulínica o la toxina del tétanos. El polipéptido puede comprender adicionalmente una cadena ligera o un fragmento o variante de un tipo de toxina y una cadena pesada o un fragmento o variante de otro tipo de toxina.

40

**[0029]** El segundo dominio preferentemente comprende una porción H<sub>N</sub> de la cadena pesada de la toxina clostridial o un fragmento o variante de una porción H<sub>N</sub> de la cadena pesada de la toxina clostridial. El fragmento es opcionalmente un fragmento N-terminal o C-terminal o interno, siempre que retenga la función del dominio H<sub>N</sub>. Por ejemplo, en Biochemistry 1995, 34, págs. 15175 – 15181 y Eur. J. Biochem, 1989, 185, págs. 197 – 203 se proporcionan muestras de regiones dentro de H<sub>N</sub> responsables de su función. La variante tiene una secuencia diferente del dominio o fragmento H<sub>N</sub>, a pesar de que también retiene la función del dominio H<sub>N</sub>. De manera conveniente se obtiene mediante inserción, eliminación y/o sustitución de un dominio H<sub>N</sub> o uno de sus fragmentos, y ejemplos de variantes incluyen (i) una extensión N-terminal a un dominio H<sub>N</sub> o uno de sus fragmentos, (ii) una extensión C-terminal a un dominio H<sub>N</sub> o uno de sus fragmentos, (iii) una modificación a un dominio H<sub>N</sub> o uno de sus fragmentos por alteración de al menos un aminoácido o (iv) combinaciones de dos o más de (i) – (iii). La toxina clostridial es preferentemente la toxina botulínica o la toxina del tétanos.

50

55

**[0030]** En la preparación de los polipéptidos por medios recombinantes, se pueden emplear procedimientos que utilizan proteínas de fusión, por ejemplo una proteína de fusión que comprende la fusión de (a) un polipéptido de la invención como se ha descrito anteriormente con (b) un segundo polipéptido adaptado para la unión a una matriz cromatográfica para así permitir la purificación de la proteína de fusión utilizando dicha matriz cromatográfica. Es conveniente adaptar el segundo polipéptido para que se una a una matriz de afinidad, tal como glutatión-sefarosa,

60

permitiendo la separación y purificación rápidas de la proteína de fusión a partir de una fuente impura, tal como un extracto o sobrenadante celular.

**[0031]** Un segundo polipéptido de purificación es la glutatión-S-transferasa (GST) , y se pueden seleccionar otros para así permitir la purificación en una columna cromatográfica según técnicas convencionales.

**[0032]** En un segundo aspecto de la invención se proporciona el uso de un agente de la invención que inhibe la secreción a partir de células inflamatorias no neuronales seleccionadas responsables de la secreción regulada.

**[0033]** En un tercer aspecto de la invención se proporciona la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad que resulta, o es causada o mantenida por secreciones procedentes de células inflamatorias no neuronales.

**[0034]** En aspectos adicionales de la invención se proporcionan agentes de la invención dirigidos a células inflamatorias no neuronales responsables de la secreción.

**[0035]** Se utiliza un agente de la invención para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de dolencias que resultan de secreciones procedentes de células inflamatorias, por ejemplo, alergias. Los ligandos adecuados para dirigir el agente a dichas células incluyen (i) para mastocitos, receptores del complemento en general, incluyendo el dominio C4 de la Fc de IgE, y anticuerpos/ligandos para el receptor del complemento C3a/C4a-R; (ii) para eosinófilos, anticuerpos/ligandos para el receptor del complemento C3a/C4a-R, el anticuerpo monoclonal dirigido contra VLA-4, el receptor dirigido contra IL5, antígenos o anticuerpos reactivos al receptor del complemento CR4; (iii) para macrófagos y monocitos, el factor estimulante de macrófagos, (iv) para macrófagos, monocitos y neutrófilos, el LPS bacteriano y los  $\beta$ -glucanos de levaduras que se unen a CR3, (v) para neutrófilos, el anticuerpo para OX42, un antígeno asociado al receptor del complemento iC3b, o IL8; (vi) para fibroblastos, receptor de la manosa 6-fosfato/factor del crecimiento  $\beta$  similar a la insulina (M6P/IGF-II) y PA2.26, un anticuerpo contra un receptor de la superficie celular para fibroblastos activos en ratones. Así, las enfermedades que se pueden tratar según la invención incluyen enfermedades seleccionadas entre alergias (rinitis alérgica estacional (fiebre del heno) , conjuntivitis alérgica, rinitis vasomotora y alergia alimentaria) , eosinofilia, asma, artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, lupus eritematoso discoide, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, hemorroides, pruritos, glomerulonefritis, hepatitis, pancreatitis, gastritis, vasculitis, miocarditis, psoriasis, eccema, fibrosis crónica inducida por radiación, cicatrización pulmonar y otros trastornos fibróticos.

**[0036]** Se ha demostrado que en linfocitos B se produce la expresión de VAMP [véase Olken, S. K. y Corley, R. B. 1998, Mol. Biol. Cell. 9, 207a]. Así, un agente según la presente invención, cuando se dirige a un linfocito B y después de su internalización y el transporte retrógrado, puede ejercer su efecto inhibitorio sobre dichas células diana.

**[0037]** En la utilización de la invención, una fracción de inserción dirigida (TM) proporciona especificidad para el BS sobre células secretoras inflamatorias no neuronales pertinentes. El componente TM del agente puede comprender una de las numerosas moléculas de unión a células, incluyendo, pero no limitado a, anticuerpos, anticuerpos monoclonales, fragmentos de anticuerpo (Fab, F(ab)'<sub>2</sub>, Fv, ScFv, etc.) , lectinas, hormonas, citoquinas, factores de crecimiento, péptidos, carbohidratos, lípidos, glicones, ácidos nucleicos o componentes del complemento.

**[0038]** La TM se selecciona de acuerdo con el tipo de célula inflamatoria no neuronal deseado al que se debe dirigir el agente de la presente invención, y preferentemente presenta una alta especificidad y/o afinidad por las células inflamatorias no neuronales diana. Preferentemente, la TM no se une sustancialmente a células neuronales de la unión muscular presináptica, y así el agente es sustancialmente no tóxico puesto que no es capaz de producir parálisis muscular. Esto supone un claro contraste con la holotoxina clostridial que se dirige a la unión muscular presináptica y produce parálisis muscular. Además, preferentemente la TM no se une sustancialmente a las células periféricas neuronales sensoriales, y así el agente no ejerce ningún efecto analgésico sustancial. Preferentemente la TM no se une sustancialmente a células neuronales, y por tanto no permite que el agente ejerza un efecto inhibitorio sobre la secreción en una célula neuronal.

**[0039]** Es sabido en la materia que la porción H<sub>C</sub> de la molécula se puede eliminar de la otra porción de la cadena H, conocida como H<sub>N</sub>, de manera que el fragmento H<sub>N</sub> permanece unido mediante un puente disulfuro a la cadena L de la neurotoxina, proporcionando un fragmento conocido como LH<sub>N</sub>. Así, en una forma de realización de la presente invención, el fragmento LH<sub>N</sub> de una neurotoxina clostridial está unido covalentemente, utilizando uniones que pueden incluir una o más regiones espaciadoras, a una TM.

**[0040]** En otra forma de realización de la invención, el dominio H<sub>C</sub> de una neurotoxina clostridial está mutado,

bloqueado o modificado, por ejemplo, mediante modificación química, para reducir o preferentemente dismantelar su capacidad de unir la neurotoxina a receptores en la sinapsis neuromuscular. Esta neurotoxina clostridial modificada a continuación se une covalentemente, utilizando uniones que pueden incluir una o más regiones espaciadoras, a una TM.

5

**[0041]** En otra forma de realización de la invención, la cadena pesada de una neurotoxina clostridial, en la que el dominio H<sub>C</sub> está mutado, bloqueado o modificado, por ejemplo, mediante modificación química, para reducir o preferentemente dismantelar su capacidad de unir la neurotoxina a receptores en la sinapsis neuromuscular, se combina con la cadena L de una neurotoxina clostridial diferente. Esta neurotoxina clostridial híbrida modificada a continuación se une covalentemente, utilizando uniones que pueden incluir una o más regiones espaciadoras, a una TM.

10

**[0042]** En otra forma de realización de la invención, el dominio H<sub>N</sub> de una neurotoxina clostridial se combina con la cadena L de una neurotoxina clostridial diferente. Esta LH<sub>N</sub> híbrida a continuación se une covalentemente, utilizando uniones que pueden incluir una o más regiones espaciadoras, a una TM.

15

**[0043]** En otra forma de realización de la invención, la cadena ligera de una neurotoxina clostridial, o un fragmento de la cadena ligera que contiene la actividad endopeptidasa, se une covalentemente, utilizando uniones que pueden incluir una o más regiones espaciadoras, a una TM que también puede llevar a cabo la internalización de la cadena L, o un fragmento de la cadena L que contiene la actividad endopeptidasa, hacia el citoplasma de las células no neuronales pertinentes responsables de la secreción.

20

**[0044]** En otra forma de realización de la invención, la cadena ligera de una neurotoxina clostridial, o un fragmento de la cadena ligera que contiene la actividad endopeptidasa, se une covalentemente, utilizando uniones que pueden incluir una o más regiones espaciadoras, o un dominio de translocación para llevar a cabo el transporte del fragmento de la endopeptidasa hacia el citosol. Ejemplos de dominios de translocación derivados de las neurotoxinas bacterianas son los siguientes :

25

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

35

Otras fuentes clostridiales incluyen - *C. butyricum*, y *C. argentinense* [para los fundamentos genéticos para la producción de toxina en *Clostridium botulinum* y *C. tetani*, véase Henderson y col. (1997) en The Clostridia : Molecular Biology and Pathogenesis, Academic Press].

40

**[0045]** Además de los dominios de translocación anteriores procedentes de fuentes clostridiales, en un agente según la presente invención se pueden emplear otras fuentes no clostridiales. Estas incluyen, por ejemplo, la toxina diftérica [Londres, E. (1992) Biochem. Biophys. Acta., 1112, pp. 25 – 51], la exotoxina A de *Pseudomonas* [Prior y col. (1992) Biochem., 31, pp. 3555 – 3559], los péptidos fusógenos de hemaglutinina del virus de la gripe [Wagner y col. (1992) PNAS, 89, pp. 7934 – 79381, y péptidos anfifílicos [Murata y col. (1992) Biochem., 31, pp. 1986 – 1992].

45

**[0046]** Durante su funcionamiento, los dominios de un agente según la presente invención están asociados entre sí. En una forma de realización, dos o más de los dominios pueden estar unidos bien directamente (por ejemplo, por unión covalente) o bien a través de una molécula enlazadora. Las técnicas de conjugación adecuadas para su utilización en la presente invención han sido bien documentadas :

50

Chemistry of protein conjugation and cross-linking. Editado por Wong, S. S. 1993, CRC Press Inc., Florida; y Bioconjugate techniques, Editado por Hermanson, G. T. 1996, Academic Press, Londres, RU.

55

**[0047]** Ahora se describirá la unión directa de dos o más Dominios con referencia a neurotoxinas clostridiales y a la nomenclatura del presente Solicitante de dominios de neurotoxinas clostridiales, a saber el Dominio B (contiene el dominio de unión) , el Dominio T (contiene el dominio de translocación) y el Dominio E (contiene el dominio proteasa) , aunque no se pretende que tenga ninguna limitación.

60

**[0048]** En una forma de realización de la presente invención, los Dominios E y T se pueden mezclar en cantidades equimolares en condiciones reductoras y se pueden acoplar covalentemente mediante diálisis repetida (por ejemplo,

a 4 °C, con agitación) , en solución salina fisiológica en ausencia de agentes reductores. En esta fase, en contraste con el Ejemplo 6 del documento WO94/21300, el complejo E-T no está bloqueado por yodoacetamida, por lo que se retienen todos los grupos -SH libres restantes.

5 **[0049]** A continuación se modifica el Dominio B, por ejemplo, por derivación con SPDP seguido de la posterior reducción. En esta reacción, el SPDP no permanece unido a una molécula espaciadora del Dominio B, sino que simplemente incrementa la eficacia de esta reacción de reducción.

10 **[0050]** El Dominio B reducido y el complejo E-T a continuación se pueden mezclar en condiciones reductoras (por ejemplo, a 4 °C) para formar un "agente" E-T-B unido a disulfuros. En otra forma de realización, se puede preparar un complejo E-T acoplado según el Ejemplo 6 del documento WO94/21300, que incluye la adición de yodoacetamida para bloquear los grupos sulfhidrilo libres. No obstante, el complejo E-T no se deriva más, y las reacciones químicas restantes hacen uso de los grupos amino libres (-NH<sub>2</sub>) sobre las cadenas laterales de los aminoácidos (por ejemplo, aminoácidos de lisina, y arginina) .

15 **[0051]** El Dominio B se puede derivar utilizando la química de las carbodiimidias (por ejemplo, utilizando EDC) para activar grupos carboxilo sobre las cadenas laterales de los aminoácidos (por ejemplo, aminoácidos glutamato, y aspartato) y el complejo E-T se puede mezclar con el Dominio B derivado para producir un complejo E-T-B acoplado covalentemente (enlace amida) .

20 **[0052]** La metodología adecuada para la creación de dicho agente es, por ejemplo, la siguiente :

25 **[0053]** El Dominio B se dializa en tampón MES (MES 0,1 M, cloruro sódico 0,1 M, pH 5,0) hasta una concentración final de 0,5 mg/ml. Se añade EDAC (clorhidrato de 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil] carbodiimida) hasta concentraciones finales de 0,2 mg/ml y se deja reaccionar durante 30 minutos a temperatura ambiente. El EDAC en exceso se retira por desalación en una columna PD-10 equilibrada con tampón MES (Farmacia) . El Dominio B derivado se concentra (hasta > 2 mg/ml) utilizando concentradores Millipore Biomax 10. El complejo E-T (1 mg/ml) se mezcla durante 16 horas a 4 °C, y el complejo E-T-B se purifica mediante cromatografía de exclusión molecular sobre una columna Superose 12 HR10/30 (Farmacia) para retirar el Dominio B sin reaccionar (tampón de columna :  
30 fosfato sódico 50 mM a pH 6,5 + NaCl 20 mM) .

35 **[0054]** Como alternativa a la unión covalente directa de los diversos Dominios de un agente según la presente invención, se pueden emplear moléculas espaciadoras adecuadas. El término molécula enlazadora se utiliza como sinónimo de molécula espaciadora. La tecnología de espaciadores estaba fácilmente disponible antes de la presente solicitud.

40 **[0055]** Por ejemplo, en el Ejemplo 6 del documento WO94/21300 (véanse renglones 3 – 5 en la página 16) se describe un agente acoplante particular (SPDP) . En el Ejemplo 6, el SPDP está unido a un complejo E-T, proporcionando así un complejo E-T que incluye una molécula enlazadora. Este complejo a continuación se hace reaccionar con un Dominio B, que queda unido al complejo E-T a través de la molécula enlazadora. En este procedimiento, el SPDP produce una región espaciadora de aproximadamente 6,8 Angstroms entre los diferentes Dominios del "agente" de la presente invención.

45 **[0056]** Una variante del SPDP conocida como LC-SPDP es idéntica en todo respecto a SPDP, excepto por una mayor longitud de la cadena. El LC-SPDP se puede utilizar para unir covalentemente dos Dominios del "agente" de la presente invención, produciendo una región espaciadora de 15,6 Angstroms entre estos Dominios.

**[0057]** Ejemplos de moléculas espaciadoras incluyen, pero no están limitados a :

- |    |   |   |
|----|---|---|
| 50 | (GGGGS) <sub>2</sub> , regiones codo de Fab           | - [véase Anand y col. (1991) J. Biol. Chem. 266, 21874 – 9];            |
|    | (GGGGS) <sub>3</sub>                                  | - [véase Brinkmann y col. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. 88, 8616 – 20]; |
| 55 | El enlazador interdominios de la celulasa             | - [véase Takkinen y col. (1991) Protein Eng, 4, 837 – 841];             |
|    | PPPIEGR   | - [véase Kim (1993) Protein Science, 2, 348 – 356];                     |
| 60 | El espaciador de tipo colágeno                        | - [véase Rock (1992) Protein Engineering, vol 5, No 6, pp 583 – 591]; y |
|    | Péptido de la toxina diftérica sensible a la tripsina | - [véase O'Hare (1990) FEBS, vol 273, No 1,2, pp 200 –                  |

204].

**[0058]** En una forma de realización adicional de la presente invención, se puede preparar un agente que tiene la estructura E-X-T-X-B, en la que "X" es una molécula espaciadora entre cada dominio, por ejemplo, de la manera siguiente :

**[0059]** El Dominio E se deriva con SPDP, pero posteriormente no se reduce. Esto produce un Dominio E derivado con SPDP.

10 **[0060]** El Dominio T se prepara de forma similar, pero posteriormente se reduce con ditioneitol 10 mM (DTT) . El DTT 10 mM presente en la preparación del Dominio T, después de la elución de una columna QAE (véase Ejemplo 6 en el documento WO94/21300) , se elimina por el paso del Dominio T a través de una columna de Sephadex G-25 equilibrada en PBS.

15 **[0061]** El Dominio T exento de agente reductor a continuación se mezcla con el Dominio E derivado con SPDP, con agitación a 4 °C durante 16 horas. El complejo E-T se aísla a partir del Dominio E libre y a partir del Dominio T mediante cromatografía de exclusión molecular (Sephadex G-150) . Después de eso, se puede seguir el mismo procedimiento que el descrito en el Ejemplo 6 del documento WO94/21300 para volver a derivar el complejo E-T con SPDP, y su posterior acoplamiento al sulfhidrilo libre sobre el Dominio B.

20

**[0062]** Los agentes según la presente invención se pueden preparar de manera recombinante.

**[0063]** En una forma de realización, la preparación de un agente recombinante puede suponer la disposición de las secuencias codificantes de la TM seleccionada y el componente de la neurotoxina clostridial en una única construcción genética. Estas secuencias codificantes se pueden disponer en marco de manera que la posterior transcripción y traducción sea continua a lo largo de ambas secuencias codificantes y dé como resultado una proteína de fusión. Todas las construcciones tendrán un codón 5' ATG que codifica una metionina N-terminal, y un codón de detención de la traducción C-terminal.

30 **[0064]** Así, la cadena ligera de una neurotoxina clostridial (o un fragmento de la cadena ligera que contiene la actividad endopeptidasa) se puede expresar de manera recombinante como proteína de fusión con una TM que también puede llevar a cabo la internalización de la cadena L (o uno de sus fragmentos) hacia el citoplasma de las células no neuronales pertinentes responsables de la secreción. La proteína de fusión expresada también puede incluir una o más regiones espaciadoras.

35

**[0065]** En el caso de un agente basado en neurotoxinas clostridiales, para producir dicho agente de manera recombinante será necesaria la siguiente información :

- 40 (i) datos de la secuencia de ADN relativos a una TM seleccionada;  
 (ii) datos la secuencia de ADN relativos al componente de la neurotoxina clostridial; y  
 (iii) un protocolo para permitir la formación y expresión de la construcción que comprende (i) y (ii) .

**[0066]** Toda la información básica anterior de (i) – (iii) está disponible fácilmente, o se puede determinar fácilmente mediante procedimientos convencionales. Por ejemplo, los documentos WO98/07864 y WO99/17806 ejemplifican la tecnología recombinante de la neurotoxina clostridial adecuada para su utilización en la presente solicitud.

45

**[0067]** Además, los procedimientos para la formación y expresión de construcciones de la presente invención pueden utilizar información procedente de las siguientes referencias y otros :

50 **[0068]** Lorberboum-Galski, H., FitzGerald, D., Chaudhary, V., Adhya, S., Pastan, I. (1988) . Cytotoxic activity of an interleukin 2-*Pseudomonas* exotoxin chimeric protein produced in *Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci U S A 85 (6) : 1922 – 6;

**[0069]** Murphy, J.R. (1988) Diphtheria-related peptide hormone gene fusions : a molecular genetic approach to chimeric toxin development. Cancer Treat Res; 37 : 123 – 40;

**[0070]** Williams, D.P., Parker, K., Bacha, P., Bishai, W., Borowski, M., Genbauffe, F., Strom, T.B., Murphy, J.R. (1987) . Diphtheria toxin receptor binding domain substitution with interleukin-2 : genetic construction and properties of a diphtheria toxin-related interleukin-2 fusion protein. Protein Eng; 1 (6) : 493 – 8;

60

**[0071]** Arora, N., Williamson, L.C., Leppla, S.H., Halpern, J.L. (1994) . Cytotoxic effects of a chimeric protein consisting of tetanus toxin light chain and anthrax toxin lethal factor in non-neuronal cells J Biol Chem, 269 (42) :

26165 – 71;

**[0072]** Brinkmann, U., Reiter, Y., Jung, S.H., Lee, B., Pastan, I. (1993) . A recombinant immunotoxin containing a disulphide-stabilized Fv fragment. Proc Natl Acad Sci U S A; 90 (16) : 7538 – 42; y

5

**[0073]** O'Hare, M., Brown, A.N., Hussain, K., Gebhardt, A., Watson, G., Roberts, L.M., Vitetta, E.S., Thorpe, P.E., Lord, J.M. (1990) . Cytotoxicity of a recombinant ricin-A-chain fusion protein containing a proteolytically-cleavable spacer sequence. FEBS Lett Oct 29 : 273 (1 – 2) : 200 – 4.

10 **[0074]** La información adecuada de la secuencia de la neurotoxina clostridial relativa a las cadenas L- y LH<sub>N</sub> se puede obtener en, por ejemplo, Kurazono, H. (1992) J. Biol. Chem., vol. 267, No. 21, pp. 14721 – 14729; y Popoff, M.R., y Marvaud, J. – C. (1999) The Comprehensive Sourcebook of Bacterial Protein Toxins, 2ª edición (ed. Alouf, J. E., y Freer, J.H.) , Academic Press, pp. 174 – 201.

15 **[0075]** De manera similar, datos adecuados de la secuencia TM están ampliamente disponibles en la materia. Alternativamente, cualquier dato necesario de las secuencias se puede obtener mediante técnicas muy conocidas por la persona experta.

20 **[0076]** Por ejemplo, el ADN que codifica el componente TM se puede clonar a partir de un organismo fuente mediante la selección de una librería de ADNc para la región codificante correcta (por ejemplo, utilizando oligonucleótidos específicos basados en la información de la secuencia conocida para sondear la librería) , el aislamiento del ADN de TM, la secuenciación de este ADN para su confirmación, y a continuación la colocación del ADN aislado en el vector de expresión adecuado para su expresión en el hospedador seleccionado.

25 **[0077]** Como alternativa al aislamiento de la secuencia a partir de una librería, se puede emplear la información disponible de la secuencia para preparar cebadores específicos para su utilización en una PCR, mediante la cual la secuencia codificante se amplifica directamente a partir del material fuente y, con la utilización de cebadores adecuados, se puede clonar directamente en un vector de expresión.

30 **[0078]** Otro procedimiento alternativo para el aislamiento de la secuencia codificante es la utilización de la información existente sobre la secuencia y la síntesis de una copia, que posiblemente incorpora alteraciones, utilizando tecnología de síntesis de ADN. Por ejemplo, los datos de la secuencia de ADN se pueden generar a partir de la información existente de una proteína y/o una secuencia de ARN. Para hacer esto (y la alternativa descrita anteriormente) , la utilización de tecnología para la síntesis de ADN permite la modificación de la preferencia  
35 codónica de la secuencia codificante para que sea óptima para el hospedador de expresión seleccionado. Esto puede dar lugar a niveles superiores de expresión de la proteína de fusión.

**[0079]** La optimización de la preferencia codónica para el hospedador de expresión se puede aplicar a las secuencias de ADN que codifican la TM y componentes clostridiales de la construcción. La optimización de la  
40 preferencia codónica es posible mediante la introducción de la secuencia proteica en *software* de bases de datos de ADN/proteínas disponibles públicamente, por ejemplo, programas disponibles en Genetics Computer Group, Inc.

**[0080]** Según un aspecto adicional de la presente invención, el ácido nucleico que codifica la cadena ligera de una neurotoxina clostridial (o un fragmento de la cadena ligera que contiene la actividad endopeptidasa) , puede estar  
45 asociado a una TM que también puede llevar a cabo la internalización del ácido nucleico que codifica la cadena L (o uno de sus fragmentos) hacia el citoplasma de las células no neuronales pertinentes responsables de la secreción. La secuencia de ácidos nucleicos puede estar acoplada a un dominio de translocación, y opcionalmente a una fracción de inserción dirigida, mediante por ejemplo unión covalente directa o a través de tecnología de moléculas espaciadoras. De manera ideal, la secuencia codificante se expresará en la célula diana.

50

**[0081]** Así, el agente de la presente invención puede ser el producto de expresión de un gen recombinante introducido independientemente en el sitio de acción preferido del agente. La tecnología de introducción de genes está ampliamente referenciada en la bibliografía [revisada en "Advanced Drug Delivery Reviews" Vol. 27, (1997) , Elsevier Science Ireland Ltd.].

55

**[0082]** Según otro aspecto, la presente invención proporciona por tanto la utilización de una cantidad eficaz no tóxica de un compuesto de la invención para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una dolencia o enfermedad que sea susceptible de tratamiento con un ácido nucleico en un mamífero, por ejemplo, un ser humano. Una dolencia o enfermedad que sea susceptible de tratamiento con un ácido nucleico puede ser, por ejemplo, una  
60 dolencia o enfermedad que se pueda tratar mediante o que requiera terapia génica. Las dolencias o enfermedades preferidas susceptibles de tratamiento, junto con las TM preferidas, ya han sido descritas previamente en esta memoria descriptiva. De forma similar, los primeros dominios preferidos que escinden una o más proteínas (por

ejemplo, SNAP-25, sinaptobrevina y syntaxina) esenciales para la exocitosis ya han sido descritos previamente en esta memoria descriptiva. Los diversos dominios de un agente para su utilización en terapia génica pueden estar unidos directa (por ejemplo, a través de un enlace covalente) o unidos indirectamente (por ejemplo, a través de una molécula espaciadora) , como por ejemplo se ha descrito previamente en esta memoria descriptiva.

5

**[0083]** La invención además proporciona un compuesto de la invención para su utilización como sustancia terapéutica activa, en particular, para su utilización para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una dolencia o enfermedad según lo expuesto en las presentes reivindicaciones.

10 **[0084]** La invención además proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un agente de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

**[0085]** Durante su utilización, el agente normalmente se empleará en forma de composición farmacéutica asociada a un vehículo, diluyente y/o excipiente farmacéutico para seres humanos, aunque la forma exacta de la composición 15 dependerá del modo de administración.

**[0086]** El agente se puede emplear, por ejemplo, en forma de aerosol o disolución nebulizable para su inhalación o en disolución estéril para la administración por vía parenteral, administración intra-articular o administración intracraneal.

20

**[0087]** Para el tratamiento de dianas celulares inflamatorias, se prefiere la administración en forma de inyección i.v., inyección subcutánea, o parche superficial.

**[0088]** En caso de inyección i.v., también debe incluir la utilización de sistemas de bombeo.

25

**[0089]** Los intervalos de dosificación para la administración de los compuestos de la presente invención son aquellos que producen el efecto terapéutico deseado. Se apreciará que el intervalo de dosificaciones necesario depende de la naturaleza precisa del conjugado, la vía de administración, la naturaleza de la formulación, la edad del paciente, la naturaleza, el grado o gravedad de la dolencia del paciente, contraindicaciones, si las hubiere, y el 30 criterio del facultativo que atiende.

**[0090]** Las dosificaciones diarias adecuadas están en el intervalo de 0,0001 – 1 mg/kg, preferentemente de 0,0001 – 0,5 mg/kg, más preferentemente de 0,002 – 0,5 mg/kg, y particularmente de manera preferente de 0,004 – 0,5 mg/kg. La dosificación unitaria puede variar desde menos de 1 µg a 30 mg, pero normalmente estará en el intervalo 35 del 0,01 a 1 mg por dosis, que se puede administrar diariamente o con menos frecuencia, tal como semanal o semestralmente.

**[0091]** No obstante, se deben esperar amplias variaciones en la dosificación requerida dependiendo de la naturaleza precisa del conjugado, y de las diferentes eficacias de las diversas vías de administración. Por ejemplo, 40 se espera que la administración por vía oral requiera dosificaciones superiores que la administración mediante inyección intravenosa.

**[0092]** Las variaciones en estos niveles de dosificación se pueden ajustar utilizando rutinas empíricas habituales para su optimización, como es bien conocido en la materia.

45

**[0093]** Las composiciones adecuadas para inyección pueden estar en forma de disoluciones, suspensiones o emulsiones, o como polvos secos que se disuelven o suspenden en un vehículo adecuado antes de su uso.

**[0094]** Las formas de dosificación unitarias fluidas normalmente se preparan utilizando un vehículo estéril exento 50 de pirógeno. Los principios activos, dependiendo del vehículo y la concentración usados, se pueden disolver o suspender en el vehículo.

**[0095]** Las disoluciones se pueden utilizar para todas las formas de administración parenteral, y se utilizan particularmente para inyección intravenosa. Para la preparación de disoluciones el compuesto se puede disolver en 55 el vehículo, volviendo la disolución isotónica, si es necesario, con la adición de cloruro sódico y esterilizándola mediante filtración a través de un filtro estéril utilizando técnicas asépticas antes de rellenar viales o ampollas estériles adecuados y sellarlos. Alternativamente, si la estabilidad de la disolución es adecuada, la disolución se puede esterilizar dentro de sus contenedores sellados mediante autoclavado.

60 **[0096]** De manera ventajosa se pueden disolver en el vehículo aditivos tales como agentes tamponantes, solubilizantes, estabilizantes, conservantes o bactericidas, agentes suspensores o emulsionantes y/o agentes anestésicos locales.

**[0097]** Los polvos secos que se disuelven o suspenden en un vehículo adecuado antes de su uso se pueden preparar rellenando un contenedor estéril con la sustancia farmacológica y otros principios previamente esterilizados utilizando técnicas asépticas en una zona estéril.

5

**[0098]** Alternativamente, el agente y otros principios se pueden disolver en un vehículo acuoso, la disolución se esteriliza por filtración y se distribuye en contenedores adecuados utilizando técnicas asépticas en una zona estéril. A continuación el producto se criodeseca y los contenedores se sellan asépticamente.

10 **[0099]** Las suspensiones parenterales, adecuadas para inyecciones intramusculares, subcutáneas o intradérmicas, se preparan esencialmente de la misma manera, excepto que el compuesto estéril se suspende en el vehículo estéril, en lugar de disolverse, y la esterilización no se puede conseguir mediante filtración. El compuesto se puede aislar en estado estéril o alternativamente se puede esterilizar después del aislamiento, por ejemplo, mediante radiación gamma.

15

**[0100]** De manera ventajosa, para facilitar la distribución uniforme del compuesto, en la composición se incluye un agente suspensor, por ejemplo, polivinilpirrolidona.

20 **[0101]** Las composiciones adecuadas para la administración a través del tracto respiratorio incluyen aerosoles, disoluciones nebulizables o polvos microfinos para su insuflación. En este último caso, se prefiere un tamaño de partícula inferior a 50 µm, especialmente inferior a 10 µm. Dichas composiciones se pueden preparar de manera convencional y se pueden emplear junto con dispositivos de administración convencionales.

25 **[0102]** El agente descrito en esta invención se puede utilizar *in vivo*, directamente o en forma de sal farmacéuticamente aceptable, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de dolencias que suponen la secreción a partir de células inflamatorias no neuronales.

**[0103]** Ahora se describirá la presente invención con referencia a los siguientes ejemplos ilustrados por los dibujos acompañantes, en los que :

30

La Fig. 1 muestra un análisis de SDS-PAGE del esquema de purificación WGA-LH<sub>N</sub>/A;

La Fig. 2 muestra la actividad de WGA-LH<sub>N</sub>/A sobre la liberación del transmisor a partir de células HIT-T15;

35 La Fig. 3 muestra la correlación de la escisión de SNAP-25 con inhibición de la liberación del neurotransmisor después de la aplicación de WGA-LH<sub>N</sub>/A a células HIT-T15;

La Fig. 4 muestra la actividad de WGA-LH<sub>N</sub>/A sobre la liberación de [<sup>3</sup>H]-noradrenalina a partir de células PC12 no diferenciadas;

40

La Fig. 5 muestra una transferencia de Western que indica la expresión de *recLH<sub>N</sub>/B* en *E. coli*;

La Fig. 6 muestra la escisión *in vitro* del péptido VAMP sintético por *recLH<sub>N</sub>/B*;

45 La Fig. 7 muestra el efecto de un pH bajo y el tratamiento con BoNT/B sobre la liberación estimulada del factor de von Willebrands (vWF) a partir de células endoteliales humanas de la vena umbilical;

La Fig. 8 muestra liberación de material de alto peso molecular marcado con [<sup>3</sup>H]-glucosamina a partir de células LS180; y

50

La Fig. 9 muestra el efecto del tratamiento a un pH bajo y con BoNT/B sobre la liberación estimulada de glucuronidasa a partir de células HL60 diferenciadas.

**[0104]** Ahora se describen las Figuras 5 – 9 con más detalle.

55

**[0105]** En referencia a la Fig. 5, MBP-LH<sub>N</sub>/B se expresó en *E. coli* como se describe en el Ejemplo 4. La Banda 1 representa el perfil de la proteína de fusión expresada en *E. coli*. La Banda 2 representa el perfil de expresión de la proteína de fusión en lisado en bruto de *E. coli*. La Banda 3 representa el perfil de la MBP-LH<sub>N</sub>/B después de purificación mediante amilosa inmovilizada. A la derecha de la figura se indican los pesos moleculares en kDa.

60

**[0106]** En referencia a la Fig. 6, se compararon diluciones de *recLH<sub>N</sub>/B* (preparadas como se describe en el Ejemplo 4) y BoNT/B en un ensayo de escisión del péptido *in vitro*. Los datos indican que el producto recombinante

presenta una actividad catalítica similar a la de la neurotoxina nativa, lo que indica que el producto recombinante se ha plegado correctamente en una conformación activa.

**[0107]** En referencia a la Fig. 7, las células se expusieron a medio a pH 4,7 con o sin BoNT/B 500 nM (células control que habían recibido medio a pH 7,4) durante 2,5 horas y a continuación se lavaron. 24 horas después se estimuló la liberación de vWF utilizando histamina 1 mM y los resultados presentados son la liberación neta estimulada menos el estado basal. Los resultados se presentan en mIU de vWF/ml y son la media  $\pm$  SEM de tres determinaciones aparte de pH 4,7 solo, que supone dos determinaciones. El pH 4,7 + BoNT/B presenta una reducción en la liberación de vWF de un 27,4 % en comparación con los controles a pH 4,7.

**[0108]** En referencia a la Fig. 8, células LS180 de carcinoma de colon que sintetizan mucina de elevado peso molecular se trataron con medio a pH 4,7 y medio a pH 4,7 que contiene la neurotoxina botulínica del tipo B (BoNT/B) 500 nM durante cuatro horas y a continuación se marcó con [<sup>3</sup>H]-glucosamina durante 18 horas. La liberación del material de alto peso molecular se estimuló con yonomicina 10  $\mu$ M y el material marcado con [<sup>3</sup>H]-glucosamina se recuperó por ultracentrifugación y tamizado de pesos moleculares en centrífuga. El radiomarcaje de la liberación del material de elevado peso molecular marcado se determinó por recuento de centelleo y la liberación neta estimulada se calculó restando los valores basales no estimulados. Los datos se expresan como desintegraciones por minuto (dpm)  $\pm$  SEM de tres determinaciones. El co-tratamiento con BoNT/B claramente inhibe la liberación de material de elevado peso molecular de estas células que sintetizan mucina y en este experimento se observó una reducción del 74,5 %.

**[0109]** En referencia a la Fig. 9, las células se expusieron a medio a pH 4,8 con o sin BoNT/B 500 nM (las células control habían recibido medio a pH 7,4) durante 2,5 horas y a continuación se lavaron y se diferenciaron durante 40 horas con la adición de dibutilil AMP cíclico 300  $\mu$ M (dbcAMP). Las células se estimularon con fMet-Leu-Phe (1  $\mu$ M) + ATP (100  $\mu$ M) en presencia de citocalasina B (5  $\mu$ M) durante 10 minutos y se determinó la  $\beta$ -glucuronidasa liberada por ensayo colorimétrico. La liberación neta estimulada se calculó restando los valores basales de liberación sin estimular de los valores estimulados y la actividad liberada se expresa como porcentaje de la actividad total presente en las células. Los datos son la media  $\pm$  SEM de tres determinaciones. El tratamiento con BoNT/B en medio a pH bajo inhibió significativamente la liberación estimulada de  $\beta$ -glucuronidasa en comparación con células tratadas con solo pH bajo ( $p = 0,0315$  cuando se somete a una prueba t de Student de dos colas con grupos de varianza distinta).

### Ejemplo 1

#### 35 Producción de un conjugado de lectina procedente de *Triticum vulgare* y LH<sub>N</sub>/A

##### Materiales

**[0110]** La lectina procedente de *Triticum vulgare* (Aglutinina del germen de trigo - WGA) se obtuvo en Sigma Ltd.

El SPDP procedía de Pierce Chemical Co.

Las columnas de desalación PD-10 eran de Pharmacia.

El dimetilsulfóxido (DMSO) se mantuvo anhidro por almacenamiento sobre un tamiz molecular.

La electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturizante con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) y la electroforesis en gel de poliacrilamida no desnaturizante se llevaron a cabo utilizando geles y reactivos de Novex.

Los demás reactivos se obtuvieron en Sigma Ltd.

**[0111]** El LH<sub>N</sub>/A se preparó según un procedimiento anterior (Shone, C. C. y Tranter, H. S. (1995) en "Clostridial Neurotoxins - The molecular pathogenesis of tetanus and botulism", (Montecucco, C., Ed.), pp. 152 – 160, Springer). Las columnas y el medio cromatográfico FPLC® se obtuvieron en Amersham Pharmacia Biotech, RU. La matriz del gel de afinidad Hz™ y los materiales eran de BioRad, RU.

##### Preparación de una columna de afinidad con anticuerpo dirigido contra BoNT/A

**[0112]** Se preparó una columna de afinidad con anticuerpos monoclonales específicos esencialmente según las sugerencias del protocolo del fabricante. En resumen, los anticuerpos monoclonales 5BA2.3 & 5BA9.3 que presentan un reconocimiento epitópico diferente en el dominio H<sub>C</sub> (Hallis, B., Fooks, S., Shone, C. y Hambleton, P. (1993) en "Botulinum and Tetanus Neurotoxins", (DasGupta, B. R., Ed.), pp. 433 – 436, Plenum Press, Nueva York)

se purificaron a partir del sobrenadante de un cultivo de tejidos de hibridoma de ratón mediante cromatografía con Proteína G (Amersham Pharmacia Biotech) . Estos anticuerpos representan una fuente de moléculas de unión específica a H<sub>C</sub> BoNT/A y se pueden inmovilizar a una matriz o se pueden utilizar libres en disolución para unir BoNT/A. En presencia de LH<sub>N</sub>/A parcialmente purificado (que no presenta dominio H<sub>C</sub>) estos anticuerpos solo se unirá a BoNT/A. Los anticuerpos 5BA2.3 & 5BA9.3 se reunieron una relación de 3 : 1 y 2 mg del anticuerpo reunido se oxidaron con la adición de peryodato sódico (concentración final del 0,2 %) antes del acoplamiento a 1 ml del gel Affi-Gel Hz™ (16 horas a temperatura ambiente) . Las eficacias de acoplamiento habitualmente fueron superiores al 65 %. La matriz se almacenó a 4 °C en presencia de azida sódica al 0,02 %.

#### 10 Estrategia de purificación para la preparación de LH<sub>N</sub>/A puro

**[0113]** El BoNT/A se trató con 17 µg de tripsina por mg de BoNT/A durante un periodo de 72 – 120 horas. Después de este tiempo no se observó ningún material de 150 kDa mediante SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie. La muestra digerida con tripsina se sometió a cromatografía (sistema FPLC®, Amersham Pharmacia Biotech) sobre una columna Mono Q® (HR5/5) para retirar la tripsina y separar la mayoría del BoNT/A del LH<sub>N</sub>/A. La muestra en bruto se cargó en una columna a pH 7 en HEPES 20 mM, NaCl 50 mM y 2 ml de fracciones de LH<sub>N</sub>/A eluidas en un gradiente de NaCl desde 50 mM a 150 mM. El pI ligeramente superior del BoNT/A (6,3) en relación al LH<sub>N</sub>/A (5,2) forzó a eluir de la columna de intercambio aniónico después de la tripsinización a cualquier resto de BoNT/A a una concentración salina inferior al LH<sub>N</sub>/A. Las fracciones que contienen LH<sub>N</sub>/A (identificadas mediante SDS-PAGE) se reunieron para su introducción en la columna de anticuerpo.

**[0114]** La mezcla de LH<sub>N</sub>/A semi-purificada se aplicó al menos 3 veces a 1 – 2 ml de una matriz de anticuerpo monoclonal inmovilizada a 20 °C. Después de un total de 3 horas en contacto con los anticuerpos inmovilizados, se extrajo del sobrenadante enriquecido en LH<sub>N</sub>/A. El atrapamiento del contaminante BoNT/A, más que la unión específica del LH<sub>N</sub>/A, permite que se mantengan las condiciones de elución óptimas para la estabilidad del LH<sub>N</sub>. Se evita, por tanto, la utilización de condiciones de elución duras, por ejemplo, pH bajo, alta concentración salina, iones caotrópicos, que pueden tener efectos perjudiciales sobre el plegamiento del polipéptido LH<sub>N</sub> y la actividad enzimática. El tratamiento de la columna de anticuerpo inmovilizado con glicina 0,2 M/HCl a pH 2,5 dio como resultado la regeneración de la columna y la elución de proteínas reactivas a BoNT/A de 150kDa.

**[0115]** A continuación la muestra enriquecida en LH<sub>N</sub>/A se aplicó 2 veces a una columna de 1 ml HiTrap® Protein G (Amersham Pharmacia Biotech) a 20 °C. Se seleccionó la Proteína G puesto que presenta una elevada afinidad por anticuerpos monoclonales de ratón. Esta etapa se incluyó para eliminar complejos de BoNT/A-anticuerpo que se puedan filtrar de la columna de inmunización. Las especies de anticuerpo se unen a la matriz de Proteína G lo que permite la elución de LH<sub>N</sub>/A purificado, esencialmente mediante el procedimiento de Shone C.C., Hambleton, P., y Melling, J. 1987, Eur. J. Biochem. 167, 175 – 180, como se describe en el documento PCT/GB00/03519.

#### Procedimientos

**[0116]** La lectina liofilizada se rehidrató en tampón fosfato salino (PBS) hasta una concentración final de 10 mg/ml. Se almacenaron alícuotas de esta disolución a -20 °C hasta su utilización.

**[0117]** La WGA se hizo reaccionar con una concentración igual de SPDP con la adición de una disolución madre de SPDP 10 mM en DMSO con mezcla. Después de una hora a temperatura ambiente, la reacción se detuvo por desalación en PBS sobre una columna PD-10.

**[0118]** El grupo saliente tiopiridona se eliminó del producto para liberar un grupo -SH libre por reducción con ditioneitol (DTT; 5 mM; 30 min) . La tiopiridona y el DTT se retiraron una vez más desalando en PBS sobre una columna PD-10.

**[0119]** El LH<sub>N</sub>/A se desaló en PBSE (PBS que contiene EDTA 1 mM) . La disolución resultante (0,5 – 1,0 mg/ml) se hizo reaccionar con un exceso molar de cuatro veces de SPDP con la adición de una disolución madre de SPDP 10 mM en DMSO. Después de 3 h a temperatura ambiente, la reacción se detuvo por desalación sobre una columna PD-10 en PBSE.

**[0120]** De la disolución se extrajo una fracción del LH<sub>N</sub>/A y se redujo con DTT (5 mM, 30 min) . Esta muestra se analizó espectrofotométricamente a 280 nm y 343 nm para determinar el grado de derivación. El grado de derivación conseguido fue de 3,53 ± 0,59 mol/mol.

**[0121]** El grueso del LH<sub>N</sub>/A derivado y la WGA derivada se mezclaron en proporciones tales que la WGA se encontraba por encima de un exceso molar de tres veces. Se dejó que la reacción de conjugación prosiguiera durante > 16 h a 4 °C.

**[0122]** La mezcla producto se centrifugó para eliminar cualquier precipitado que se hubiera producido. El sobrenadante se concentró por centrifugación en concentradores (con un límite de exclusión molecular de 10.000) antes de su aplicación a una columna Superose 12 sobre un sistema cromatográfico FPLC (Pharmacia) . La columna se eluyó con PBS y el perfil de elución se siguió a 280 nm.

**[0123]** Las fracciones se analizaron mediante SDS-PAGE sobre geles con gradiente de poliacrilamida del 4 – 20 %, seguido de tinción con azul de Coomassie. Los productos conjugados principales tienen una masa molecular aparente de entre 106 – 150 kDa, y estos se separan del grueso del LH<sub>N</sub>/A restante sin conjugar y más completamente de la WGA sin conjugar. Las fracciones que contienen el conjugado se reunieron antes de la adición de N-acetilglucosamina-agarosa lavado con PBS. Las proteínas que contienen lectina (es decir, el conjugado WGA-LH<sub>N</sub>/A) permanecieron unidas a la agarosa durante el lavado con PBS para eliminar los contaminantes (predominantemente LH<sub>N</sub>/A sin conjugar) . El conjugado WGA-LH<sub>N</sub>/A se eluyó de la columna con la adición de N-acetilglucosamina 0,3 M (en PBS) y el perfil de elución se siguió a 280 nm. Véase Fig. 1 para el perfil SDS-PAGE del esquema de purificación completo.

**[0124]** Las fracciones que contienen el conjugado se reunieron, se dializaron contra PBS, y se almacenaron a 4 °C hasta su utilización.

## 20 Ejemplo 2

### Actividad de WGA-LH<sub>N</sub>/A en células endocrinas cultivadas (HIT-T15)

**[0125]** La línea de linfocitos B pancreáticos de hámster HIT-T15 es un ejemplo de línea celular de origen endocrino. Así representa un modelo de línea celular para la investigación de los efectos de la inhibición de la liberación de los agentes. Las células HIT-T15 poseen fracciones superficiales que permiten la unión, y la internalización, de WGA-LH<sub>N</sub>/A.

**[0126]** En contraste, las células HIT-T15 carecen de receptores adecuados para las neurotoxinas clostridiales y por tanto no son susceptibles a las neurotoxinas botulínicas (BoNTs) .

**[0127]** La Fig. 2 ilustra la inhibición de liberación de insulina procedente de células HIT-T15 después de la incubación previa con WGA-LH<sub>N</sub>/A. Se observa claramente una inhibición dependiente de la dosis, lo que indica que WGA-LH<sub>N</sub>/A puede inhibir la liberación de insulina en un modelo de células endocrinas.

**[0128]** Se demostró que la inhibición de la liberación de insulina está correlacionada con la escisión de la proteína SNARE, SNAP-25 (Fig. 3) . Así, la inhibición de la liberación del mensajero químico se debe a los efectos de la escisión de la proteína SNARE mediados por la endopeptidasa clostridial.

## 40 Materiales

Los kits para los radioinmunoensayos con insulina se obtuvieron en Linco Research Inc., EE.UU.

**[0129]** Los reactivos para la transferencia de Western se obtuvieron en Novex.

## 45 Procedimientos

**[0130]** Se sembraron células HIT-T15 en placas de 12 pocillos y se cultivaron en medio RPMI-1640 que contiene suero fetal bovino al 5 % y L-glutamina 2 mM durante 5 días antes de su utilización. El WGA-LH<sub>N</sub>/A se aplicó durante 4 horas en hielo, las células se lavaron para retirar el WGA-LH<sub>N</sub>/A no unido, y la liberación de insulina se sometió a ensayo 16 horas más tarde. La liberación de insulina a partir de células HIT-T15 se valoró mediante radioinmunoensayo exactamente como indican las instrucciones del fabricante.

**[0131]** Las células se lisaron en ácido acético 2 M/TEA al 0,1 %. Los lisados se secaron, y a continuación se resuspendieron en Hepes 0,1 M, a pH 7,0. Para extraer las proteínas de membrana se añadió Triton-X-114 (10 %, v/v) y se incubó a 4 °C durante 60 min. El material insoluble se retiró por centrifugación y los sobrenadantes se calentaron a 37 °C durante 30 min. Las dos fases resultantes se separaron por centrifugación y la fase superior se descartó. Las proteínas de la fase inferior se precipitaron con cloroformo/metanol para su análisis mediante transferencia de Western.

**[0132]** Las muestras se separaron mediante SDS-PAGE y se transfirieron a nitrocelulosa. La proteólisis de SNAP-25, un componente crucial del proceso neurosecretor y el sustrato para la actividad endopeptidasa dependiente de

cinc de BoNT/A se detectó a continuación mediante una sonda con un anticuerpo (SMI-81) que reconoce tanto la forma intacta como escindida de SNAP-25.

### Ejemplo 3

5

#### Actividad de WGA-LH<sub>N</sub>/A en células neuroendocrinas cultivadas (PC12)

[0133] La línea celular PC12 de feocromocitoma de rata es un ejemplo de línea celular de origen neuroendocrino. En su forma no diferenciada tiene propiedades asociadas a las células de la cromafina adrenal [Greene y Tischler, 10 en "Advances in Cellular Neurobiology" (Federoff y Hertz, eds.) , Vol. 3, págs. 373 – 414. Academic Press, Nueva York, 1982]. Así, representa un modelo de línea celular para la investigación de los efectos de la inhibición de la liberación de los agentes. Las células PC12 poseen fracciones superficiales que permiten la unión, y la internalización, de WGA-LH<sub>N</sub>/A. La Figura 4 ilustra la inhibición de la liberación de noradrenalina a partir de células PC12 después de la incubación previa con WGA-LH<sub>N</sub>/A. Se observa claramente una inhibición que depende de la 15 dosis, lo que indica que WGA-LH<sub>N</sub>/A puede inhibir la liberación de hormona en un modelo de células neuroendocrinas. La comparación de los efectos de la inhibición observados con el conjugado y el LH<sub>N</sub>/A no dirigido demuestra los requerimientos para una fracción de inserción dirigida (TM) para una inhibición eficiente de la liberación de transmisor.

#### 20 Procedimientos

[0134] Se cultivaron células PC12 en placas de 24 pocillos en medio RPMI-1640 que contiene suero de caballo al 10 %, suero fetal bovino al 5 %, y 1 % de L-glutamina. Las células se trataron con un intervalo de concentraciones de WGA-LH<sub>N</sub>/A durante tres días. La secreción de noradrenalina se midió mediante el marcaje de células con [<sup>3</sup>H]- 25 noradrenalina (2 µCi/ml, 0,5 ml/pocillo) durante 60 min. Las células se lavaron cada 15 min durante 1 hora y a continuación se determinó la liberación basal mediante la incubación con una solución salina equilibrada que contiene KCl 5 mM durante 5 min. La secreción se estimuló elevando la concentración de potasio extracelular (KCl 100 mM) durante 5 min. Se determinó la radiactividad en superfusados basales y estimulados mediante recuento por centelleo. La secreción se expresa como porcentaje de la captación total y la secreción estimulada se calculó 30 restando los valores basales. La inhibición de la secreción dependía de la dosis con una CI<sub>50</sub> observada de 0,63 ± 0,15 µg/ml (n = 3) . La inhibición fue significativamente más potente cuando se compara con la endopeptidasa sin dirigir (LH<sub>N</sub>/A en la Fig. 4) . Así, el WGA-LH<sub>N</sub>/A inhibe la liberación del neurotransmisor en un modelo de tipo celular neuroendocrino.

### 35 Ejemplo 4

#### Expresión y purificación de LH<sub>N</sub>/B recombinante catalíticamente activo

[0135] La región codificante para LH<sub>N</sub>/B se insertó en marco en 3' del gen que codifica la proteína de unión a la maltosa (MBP) en el vector de expresión pMAL (New England Biolabs) . En esta construcción, los polipéptidos MBP y LH<sub>N</sub>/B expresados están separados por un sitio de escisión del Factor Xa.

[0136] La expresión del MBP-LH<sub>N</sub>/B en *E. coli* TG1 se indujo con la adición de IPTG al cultivo del crecimiento a una DO600nm aproximada de 0,8. La expresión se mantuvo durante 3 horas más en presencia de un agente 45 inductor antes de recoger por centrifugación. La pasta de células recuperadas se almacenó a -20 °C hasta que fue necesaria.

[0137] La pasta de células se resuspendió en tampón de resuspensión (Hepes 50 mM a pH 7,5 + NaCl 150 mM + una variedad de inhibidores de proteasa) a 6 ml de tampón por gramo de pasta. A esta suspensión se le añadió 50 lisozima a una concentración final de 1 mg/ml. Después de 10 min a 0 °C, la suspensión se sometió a sonicación durante 6 x 30 segundos a 24µ a 0 °C. La pasta de células rotas a continuación se centrifugó para retirar los restos celulares y el sobrenadante se recuperó para cromatografía.

[0138] En algunas situaciones, la pasta de células se sometió a disrupción utilizando agentes de disrupción 55 patentados tales como BugBuster™ (Novagen) según el protocolo del fabricante. Estos agentes sometieron satisfactoriamente las células a disrupción para proporcionar material sobrenadante para la cromatografía de afinidad.

[0139] El sobrenadante se aplicó a una matriz de amilosa inmovilizada a 0,4 ml/min para facilitar la unión de la 60 proteína de fusión. Después de la unión, la columna se lavó exhaustivamente con tampón de resuspensión para retirar las proteínas contaminantes. Las proteínas unidas se eluyeron con la adición de tampón de elución (tampón de resuspensión + maltosa 10 mM) y las fracciones se recogieron. Las fracciones eluidas que contienen la proteína

se reunieron para su tratamiento con el Factor Xa.

**[0140]** En algunas ocasiones, se incorporó una etapa de purificación adicional al esquema, antes de la adición del Factor Xa. En estos casos, las fracciones eluidas contenían DTT 5 mM y se aplicaron a una columna Mono-Q HR5/5 de Pharmacia (equilibrada en tampón de resuspensión) como parte de un sistema FPLC. Las proteínas se unieron a la columna a NaCl 150 mM, antes de incrementar hasta NaCl 500 mM en un gradiente. Las fracciones se recogieron y se analizaron para la presencia de MBP-LH<sub>N</sub>/B mediante transferencia de Western (anticuerpo de la sonda = anti-BoNT/B de cobaya o anti-MBP obtenido comercialmente) .

10 **[0141]** La escisión de la proteína de fusión por el Factor Xa se realizó como se describe en el protocolo suministrado por el fabricante (New England Biolabs) . La escisión de la proteína de fusión produjo la eliminación del marcador de fusión de la MBP y la separación de los dominios LC y H<sub>N</sub> de LH<sub>N</sub>/B. El paso de la mezcla escindida a través de una segunda columna de maltosa inmovilizada retiró la MBP libre de la mezcla para dejar el LH<sub>N</sub>/B purificado unido a disulfuro. Este material se utilizó para la conjugación.

15

**[0142]** Véase la Figura 5 para una ilustración de la purificación de LH<sub>N</sub>/B.

**[0143]** Véase la Figura 6 para una ilustración de la actividad catalítica *in vitro* de LH<sub>N</sub>/B.

## 20 Ejemplo 5

### Producción de un conjugado de lectina procedente de *Triticum vulgare* y LH<sub>N</sub>/B

#### *Materiales*

25

**[0144]** La lectina procedente de *Triticum vulgare* (WGA) se obtuvo en Sigma Ltd. El LH<sub>N</sub>/B se preparó como se ha descrito en el Ejemplo 4.

El SPDP procedía de Pierce Chemical Co.

30

Las columnas de desalación PD-10 eran de Pharmacia.

El dimetilsulfóxido (DMSO) se mantuvo anhidro por almacenamiento sobre un tamiz molecular.

35

La electroforesis en gel de poliacrilamida se llevó a cabo utilizando geles y reactivos de Novex.

Los demás reactivos se obtuvieron en Sigma Ltd.

#### 40 *Procedimientos*

**[0145]** La lectina liofilizada se rehidrató en tampón fosfato salino (PBS) hasta una concentración final de 10 mg/ml. Se almacenaron alícuotas de esta disolución a -20 °C hasta su utilización.

45 **[0146]** La WGA se hizo reaccionar con una concentración igual de SPDP con la adición de una disolución madre de SPDP 10 mM en DMSO con agitación. Después de una hora a temperatura ambiente, la reacción se detuvo por desalación en PBS sobre una columna PD-10.

50 **[0147]** El grupo saliente tiopiridona se eliminó del producto para liberar un grupo -SH libre por reducción con ditioneitol (DTT; 5 mM; 30 min) . La tiopiridona y el DTT se retiraron desalando una vez más en PBS sobre una columna PD-10.

**[0148]** El *re*LH<sub>N</sub>/B se desaló en PBS. La disolución resultante (0,5 – 1,0 mg/ml) se hizo reaccionar con un exceso molar de cuatro veces de SPDP con la adición de una disolución madre de SPDP 10 mM en DMSO. Después de 3 h a temperatura ambiente, la reacción se detuvo por desalación sobre una columna PD-10 en PBS.

55

**[0149]** De la disolución se extrajo una fracción del *re*LH<sub>N</sub>/A y se redujo con DTT (5 mM, 30 min) . Esta muestra se analizó espectrofotométricamente a 280 nm y 343 nm para determinar el grado de derivación.

60 **[0150]** El grueso del *re*LH<sub>N</sub>/B derivado y la WGA derivada se mezclaron en proporciones tales que la WGA se encontraba por encima de un exceso molar de tres veces. Se dejó que la reacción de conjugación prosiguiera durante > 16 h a 4 °C.

[0151] La mezcla producto se centrifugó para eliminar cualquier precipitado que se hubiera producido. El sobrenadante se concentró por centrifugación en concentradores (con un límite de exclusión molecular de 10.000) antes de su aplicación a una columna Superdex G-200 sobre un sistema cromatográfico FPLC (Pharmacia) . La columna se eluyó con PBS y el perfil de elución se siguió a 280 nm.

[0152] Las fracciones se analizaron mediante SDS-PAGE sobre geles con gradiente de poliacrilamida del 4 – 20 %, seguido de tinción con azul de Coomassie. Los productos conjugados principales tienen una masa molecular aparente de entre 106 – 150 kDa, y estos se separan del grueso del *recLH<sub>N</sub>/A* restante sin conjugar y más completamente de la WGA sin conjugar. Las fracciones que contienen el conjugado se reunieron antes de la adición de N-acetilglucosamina-agarosa lavado con PBS. Las proteínas que contienen lectina (es decir, el conjugado WGA-*recLH<sub>N</sub>/B*) permanecieron unidas a la agarosa durante el lavado con PBS para eliminar los contaminantes (predominantemente *recLH<sub>N</sub>/B* sin conjugar) . El conjugado WGA-*recLH<sub>N</sub>/B* se eluyó de la columna con la adición de N-acetilglucosamina 0,3 M (en PBS) y el perfil de elución se siguió a 280 nm.

[0153] Las fracciones que contienen el conjugado se reunieron, se dializaron contra PBS, y se almacenaron a 4 °C hasta su utilización.

### Ejemplo 6

#### Actividad de BoNT/B en células endoteliales vasculares

[0154] Las células endoteliales humanas de la vena umbilical (HUVEC) segregan factor de von Willebrands (vWF) cuando se estimulan con una variedad de agonistas del receptor de la superficie celular, incluyendo la histamina. Estas células mantienen esta propiedad cuando se preparan a partir de cordones umbilicales que se han desarrollado completamente y crecidos en cultivo (Loesberg y col. 1983, *Biochim. Biophys. Acta.* 763, 160 – 168) . La liberación de vWF por las HUVEC representa así una actividad secretora de un tipo celular no neuronal derivado del sistema cardiovascular. La Fig. 7 ilustra la inhibición de la liberación estimulada con histamina de vWF por las HUVEC cuando se tratan previamente con BoNT/B en un medio a pH bajo. El tratamiento de las células con toxinas a pH bajo se puede utilizar como técnica para facilitar la penetración de la toxina a través de la membrana plasmática de células refractarias a neurotoxinas clostridiales aplicadas de forma exógena.

[0155] Este resultado muestra claramente la capacidad de las neurotoxinas botulínicas para inhibir la actividad secretora de células no neuronales en el sistema cardiovascular (véase Fig. 7) .

#### Procedimientos

[0156] Las HUVEC se prepararon mediante el procedimiento de Jaffe y col. 1973, *J. Clin. Invest.* 52, 2745 – 2756. Las células se pasaron una vez sobre placas de 24 pocillos en medio 199 suplementado con suero fetal bovino al 10 %, suero neonatal bovino al 10 %, L-glutamina 5 mM, 100 unidades/ml de penicilina, 100 U/ml de estreptomycin, y 20 µg/ml de factor de crecimiento de las células endoteliales (Sigma) . Las células se trataron con DMEM a pH 7,4, DMEM a pH 4,7 (pH reducido con HCl) o DMEM, a pH 4,7 con BoNT/B 500 nM durante 2,5 horas y a continuación se lavó tres veces con medio HUVEC. 24 horas después las células se lavaron con una disolución salina equilibrada, a pH 7,4 y se expusieron a esta disolución durante 30 minutos para establecer la liberación basal. Esta disolución se retiró y se aplicó BSS que contiene histamina 1 mM durante 30 minutos más. Los superfusados se centrifugaron para retirar todas las células desprendidas y la cantidad de vWF se determinó utilizando un ensayo de ELISA como se describe por Paleolog y col. 1990, *Blood.* 75, 688 – 695. A continuación se calculó la secreción estimulada restando los valores basales de la liberación estimulada con histamina. La inhibición por tratamiento con BoNT/B a pH 4,7 se calculó en un 27,4 % cuando se compara con el tratamiento a pH 4,7 solo.

### Ejemplo 7

#### Actividad de BoNT/B en células secretoras de moco

[0157] La línea celular de carcinoma de colon LS180 es reconocida como modelo de células secretoras de mucina (McCool, D. J., Forstner, J. F. y Forstner, G. G. 1994 *Biochem. J.* 302, 111 – 118) . Se ha demostrado que estas células adoptan una morfología de células calciformes y liberan mucina de elevado peso molecular cuando se estimulan con agonistas muscarínicos (por ejemplo, carbacol) , ésteres de forbol (PMA) e ionóforos de Ca<sup>2+</sup> (por ejemplo, A23187) (McCool, D. J., Forstner, J. F. y Forstner, G. G. 1995 *Biochem. J.* 312, 125 – 133) . Así, estas células representan un tipo celular no neuronal derivado de colon que pueden experimentar secreción regulada de mucina. La Fig. 8 ilustra la inhibición de la liberación estimulada de yonomicina de material de elevado peso molecular marcado con [<sup>3</sup>H]-glucosamina a partir de células LS180 mediante tratamiento previo con BoNT/B en un

medio a pH bajo. La yonomicina es un ionóforo de  $\text{Ca}^{2+}$  y anteriormente se ha demostrado que el tratamiento de las células con un medio a pH bajo facilita la entrada de toxinas en las células.

**[0158]** Este resultado muestra claramente la capacidad de las neurotoxinas botulínicas para inhibir la actividad secretora de células no neuronales capaces de liberar mucina cuando se estimulan con un secretagogo (véase Fig. 8).

#### *Procedimientos*

10 **[0159]** Se hicieron crecer células de carcinoma de colon LS180 que sintetizan mucina en placas de 24 pocillos recubiertas con Matrigel en medio esencial mínimo suplementado con suero fetal bovino al 10 %, L-glutamina 2 mM y aminoácidos no esenciales al 1 % (Sigma). Las células se trataron con medio a pH 7,4, medio a pH 4,7 y medio a pH 4,7 que contiene neurotoxina botulínica de tipo B 500 nM (BoNT/B) durante cuatro horas y a continuación se marcaron con [ $^3\text{H}$ ]-glucosamina (1  $\mu\text{Ci/ml}$ , 0,5 ml/pocillo) durante 18 horas en medio L15 exento de glucosa. A 15 continuación las células se lavaron dos veces con disolución salina equilibrada (BSS) a pH 7,4 y a continuación se aplicaron 0,5 ml de BSS durante 30 minutos. Este material se extrajo y se aplicaron 0,5 ml de BSS que contiene yonomicina 10  $\mu\text{M}$  para estimular la liberación de mucina. Se retiró la disolución estimulante y todos los superfusados se centrifugaron para eliminar todas las células desprendidas. A continuación los sobrenadantes se centrifugaron a 100.000 x g durante 1 hora. Los sobrenadantes se aplicaron a concentradores de centrifuga 20 Centricon con un límite de peso molecular de 100 kDa y se centrifugaron (2500 x g) hasta que todo el líquido hubo pasado a través de la membrana. Las membranas se lavaron con BSS centrifugando tres veces y la membrana se sometió a recuento por centelleo para el material de elevado peso molecular marcado con [ $^3\text{H}$ ]-glucosamina retenido.

#### **Ejemplo 8**

##### **Actividad de BoNT/B en células inflamatorias**

30 **[0160]** La línea celular promielocítica HL60 se puede diferenciar en células de tipo neutrófilo con la adición de dibutilil AMP cíclico al medio de cultivo. Tras la diferenciación, estas células incrementan su expresión de enzimas características como la  $\beta$ -glucuronidasa. En estas condiciones, estas células representan un modelo de tipo celular fagocítico que contribuye a la respuesta inflamatoria de ciertos estados patológicos (por ejemplo, artritis reumatoide). La Figura 9 ilustra la importante inhibición ( $p > 0,05$ ) de la liberación estimulada de  $\beta$ -glucuronidasa a partir de 35 células HL60 diferenciadas con dbcAMP mediante el tratamiento previo con BoNT/B en medio a pH bajo.

**[0161]** Este resultado muestra claramente la capacidad de las neurotoxinas botulínicas para inhibir la actividad secretora de un tipo celular no neuronal que es un modelo de células de neutrófilo que participan en la inflamación.

#### *Procedimientos*

40 **[0162]** Se cultivaron células HL60 en medio RPMI 1640 que contiene suero fetal bovino al 10 % y glutamina 2 mM. Las células se expusieron a pH bajo y a la toxina durante 2,5 horas y a continuación se lavaron 3 veces y se diferenciaron con la adición de dibutilil AMP cíclico (dbcAMP) hasta una concentración final de 300  $\mu\text{M}$ . Las células se diferenciaron durante 40 horas y a continuación se determinó la liberación estimulada de la actividad 45 glucuronidasa. Las células se trataron con citocalasina B (5  $\mu\text{M}$ ) 5 minutos antes de su estimulación. Las células se estimularon con N-formil-Met-Leu-Phe 1  $\mu\text{M}$  y con ATP 100  $\mu\text{M}$  durante 10 minutos y a continuación se centrifugaron y el sobrenadante se tomó para el ensayo de la actividad  $\beta$ -glucuronidasa. La actividad se midió en los lisados celulares y la cantidad liberada se expresa como porcentaje del contenido celular total de encima.

50 **[0163]** La actividad  $\beta$ -glucuronidasa se determinó según el procedimiento de Absolom D.R. 1986, (Methods in Enzymology, 132, 160) utilizando p-Nitrofenil- $\beta$ -D-glucurónido como sustrato.

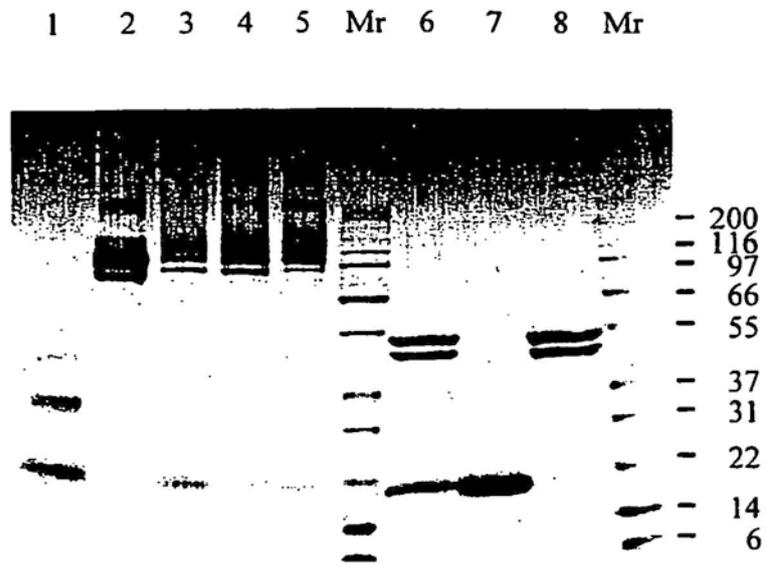
## REIVINDICACIONES

1. El uso de un agente para la fabricación de un medicamento para inhibir la secreción a partir de una célula inflamatoria no neuronal, dicho agente que comprende un primer, un segundo y un tercer dominios  
5 en el que el primer dominio comprende una cadena ligera de la neurotoxina clostridial o un fragmento de la misma que escinde una o más proteínas esenciales para la exocitosis,
- el segundo dominio comprende un dominio de translocación seleccionado del grupo constituido por la porción H<sub>N</sub> de la cadena pesada de una toxina clostridial, un dominio de translocación de la toxina diftérica, el dominio de  
10 translocación de la exotoxina A de *Pseudomonas*, un dominio de translocación fusógeno de la hemaglutinina del virus de la gripe, un dominio de translocación del péptido anfifílico, y fragmentos de los mismos que producen la translocación del primer dominio hacia la célula inflamatoria,
- 15 y el tercer dominio comprende una fracción de inserción dirigida que se une con una alta especificidad y/o afinidad a un Sitio de unión en la superficie de dicha célula inflamatoria no neuronal, en donde la fracción de inserción dirigida se selecciona del grupo constituido por anticuerpos, anticuerpos monoclonales, fragmentos de anticuerpos, lectinas, hormonas, citoquinas, factores de crecimiento, péptidos, carbohidratos, lípidos, glicones, y los componentes del complemento.  
20
2. Uso según la reivindicación 1, para el tratamiento de enfermedades causadas, exacerbadas o mantenidas por la secreción de dicha célula inflamatoria no neuronal.
3. Uso según la reivindicación 1, en donde el tercer dominio comprende o consiste en un ligando  
25 seleccionado entre (i) para los mastocitos, receptores del complemento en general, incluyendo el dominio C4 de la Fc de IgE, y los anticuerpos/ligandos para el receptor del complemento C3a/C4a-R, (ii) para eosinófilos, anticuerpos/ligandos para el receptor del complemento C3a/C4a-R, anticuerpo monoclonal dirigido contra VLA-4, anticuerpo dirigido contra el receptor de IL-5, antígenos o anticuerpos reactivos al receptor del complemento CR4 (iii) para macrófagos y monocitos, factor estimulante de macrófagos, (iv) para macrófagos, monocitos y neutrófilos, LPS  
30 bacteriano y B-glucanos de levaduras que se unen a CR3, (v) para neutrófilos, anticuerpos para OX42, un antígeno asociado al receptor del complemento iC3b, o IL8, (vi) para fibroblastos, receptor de la manosa 6-fosfato/factor de crecimiento β similar a la insulina (M6P/IGP-II) y PA2.26, anticuerpo para un receptor de la superficie celular para fibroblastos activos en ratones, y (vii) factores de crecimiento.
- 35 4. Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, para el tratamiento de una enfermedad seleccionada del grupo constituido por alergias (rinitis alérgica estacional (fiebre del heno) , conjuntivitis alérgica, rinitis vasomotora y alergia alimentaria) , eosinofilia, asma, artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, lupus eritematoso discoide, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, hemorroides, prurito, glomerulonefritis, hepatitis, pancreatitis, gastritis, vasculitis, miocarditis, psoriasis, eccema y fibrosis crónica inducida por radiación, cicatrización  
40 pulmonar y otros trastornos fibróticos.
5. Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el agente comprende un primer dominio que escinde una proteína seleccionada entre SNAP-25, sinaptobrevina y syntaxina.
- 45 6. Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el segundo dominio comprende una región H<sub>N</sub> de un polipéptido clostridial o un fragmento del mismo que produce la translocación de la actividad inhibidora de la exocitosis del primer dominio hacia la célula.
7. Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores para la inhibición de la liberación constitutiva y  
50 regulada a partir de las células inflamatorias no neuronales.
8. Un agente para inhibir la secreción a partir de una célula inflamatoria no neuronal, que comprende al menos el primer, el segundo y el tercer dominio
- 55 en el que el primer dominio comprende una cadena ligera de la neurotoxina clostridial o un fragmento de la misma que escinde una o más proteínas esenciales para la exocitosis,
- el segundo dominio comprende un dominio de translocación seleccionado del grupo constituido por la porción H<sub>N</sub> de la cadena pesada de una toxina clostridial, un dominio de translocación de la toxina diftérica, un dominio de  
60 translocación de la exotoxina A de *Pseudomonas*, un dominio de translocación fusógeno de la hemaglutinina del virus de la gripe, un dominio de translocación del péptido anfifílico, y fragmentos de los mismos que producen la translocación del primer dominio hacia la célula,

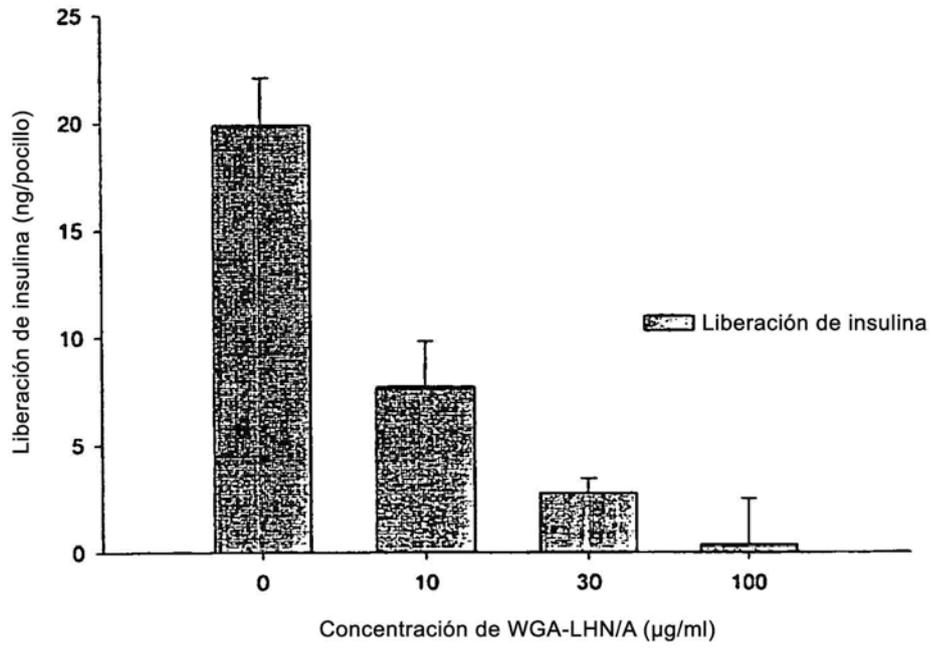
y el tercer dominio comprende una fracción de inserción dirigida que se une con una alta especificidad y/o afinidad a un Sitio de unión en la superficie de una célula inflamatoria no neuronal, en donde la fracción de inserción dirigida se selecciona del grupo constituido por anticuerpos, anticuerpos monoclonales, fragmentos de anticuerpos, lectinas, hormonas, citoquinas, factores de crecimiento, péptidos, carbohidratos, lípidos, glicones, y los componentes del complemento.

9. Un agente según la reivindicación 8, en donde el tercer dominio es como se define en la reivindicación 3.
10. Una composición farmacéutica que comprende un agente según la reivindicación 8 o 9 en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.
11. El uso de un agente según la reivindicación 8 o 9 o una composición farmacéutica según la reivindicación 10, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad causada, exacerbada o mantenida por la secreción de una célula inflamatoria no neuronal.
12. Una construcción de ácidos nucleicos que codifica un agente según la reivindicación 8 o 9, dicha construcción que comprende secuencias de ácidos nucleicos que codifican el primer, segundo y tercer dominios.
13. Una construcción de ácidos nucleicos según la reivindicación 12, unida de manera operable a secuencias promotoras y terminadoras, y opcionalmente a secuencias reguladoras, dichas secuencias promotoras, terminadoras y reguladoras que son funcionales en una célula diana inflamatoria no neuronal para llevar a cabo la expresión de dicho agente en dicha célula diana.
14. Un agente para su uso en terapia génica, que comprende :
- (i) una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un primer dominio que comprende una cadena ligera de una neurotoxina clostridial o un fragmento de la misma que escinde una o más proteínas esenciales para la excitosis,
- (ii) un segundo dominio asociado a la secuencia de ácidos nucleicos, en donde dicho segundo dominio comprende un dominio de translocación seleccionado del grupo constituido por la porción H<sub>N</sub> de la cadena pesada de una toxina clostridial, un dominio de translocación de la toxina diftérica, un dominio de translocación de la exotoxina A de *Pseudomonas*, un dominio de translocación fusógeno de la hemaglutinina del virus de la gripe, un dominio de translocación del péptido anfifílico, y fragmentos de los mismos, que, después de la administración del agente a un paciente, producen la translocación de la secuencia de ácidos nucleicos hacia la célula diana inflamatoria no neuronal en la que, cuando está presente en dicha célula diana inflamatoria no neuronal, la expresión de la secuencia de ácidos nucleicos se produce en ella; y
- (iii) un tercer dominio que comprende una fracción de inserción dirigida que se une con una alta especificidad y/o afinidad a un sitio de unión en la superficie para determinar el direccionamiento del agente a dicha célula inflamatoria no neuronal, en donde la fracción de inserción dirigida se selecciona del grupo constituido por anticuerpos, anticuerpos monoclonales, fragmentos de anticuerpos, lectinas, hormonas, citoquinas, factores de crecimiento, péptidos, carbohidratos, lípidos, glicones, y los componentes del complemento.
15. Un agente según la reivindicación 14, en donde la secuencia de ácidos nucleicos está unida de manera operable a las secuencias promotoras y terminadoras, y opcionalmente a secuencias reguladoras, dichas secuencias promotoras, terminadoras y reguladoras que son funcionales en una célula diana inflamatoria no neuronal para llevar a cabo la expresión de dicho agente en dicha célula diana inflamatoria no neuronal.
16. Un agente según la reivindicación 14 o 15, en el que el tercer dominio es como se define en la reivindicación 3.
17. Uso de un agente según cualquiera de las reivindicaciones 14 – 16 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad causada, exacerbada o mantenida por la secreción a partir de una célula inflamatoria no neuronal.
18. Uso de una construcción de ácidos nucleicos según la reivindicación 12 ó 13 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad causada, exacerbada, o mantenida por la secreción a partir de

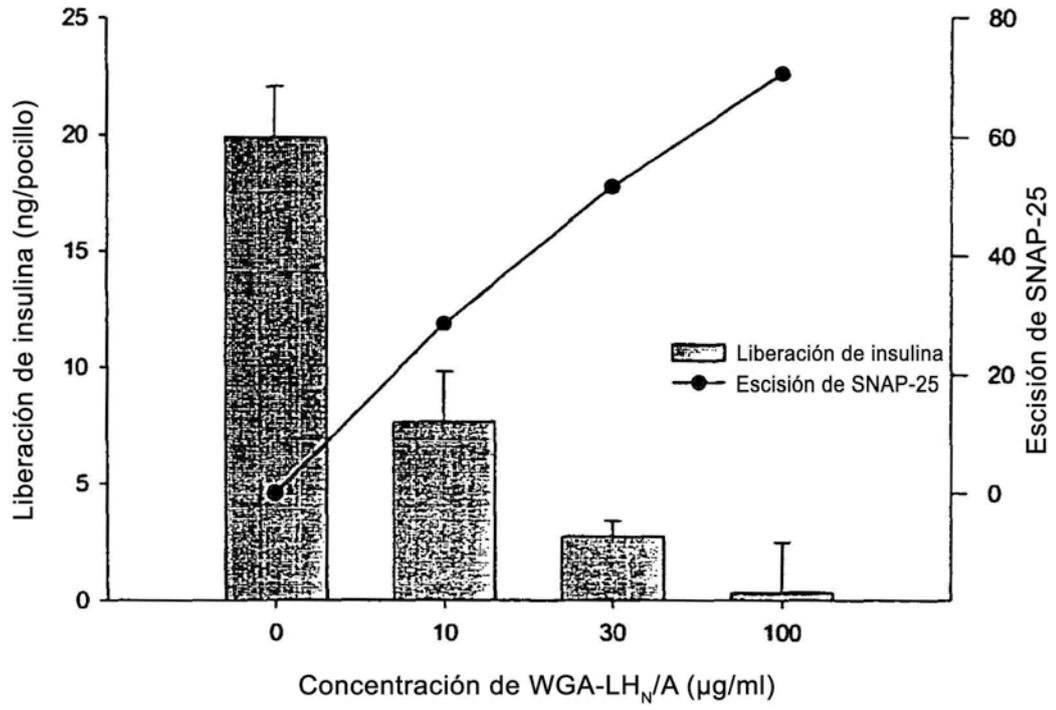
una célula inflamatoria no neuronal.



**FIG. 1**



**FIG. 2**



**FIG. 3**

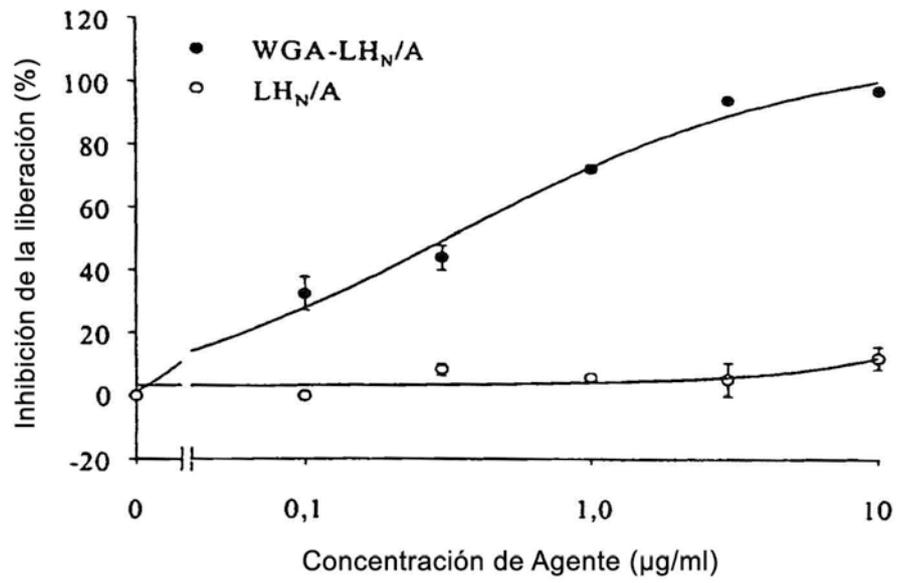


FIG. 4

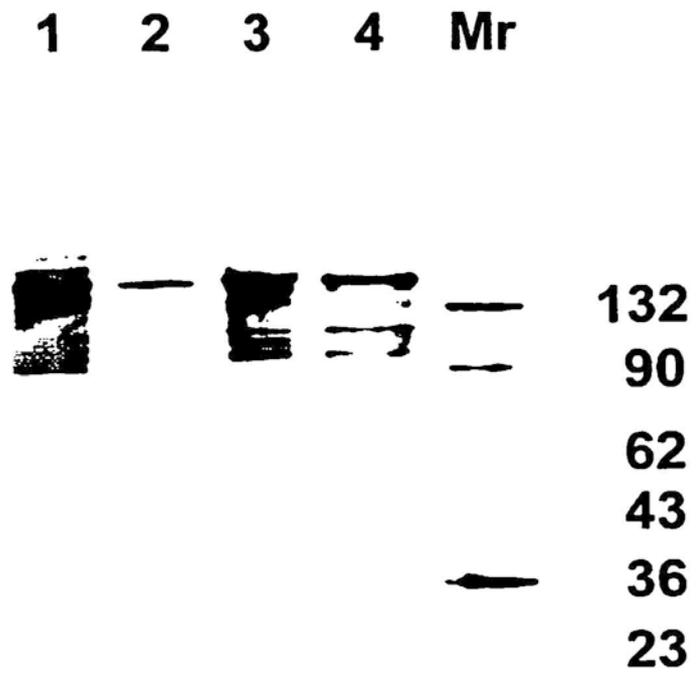


Fig. 5.

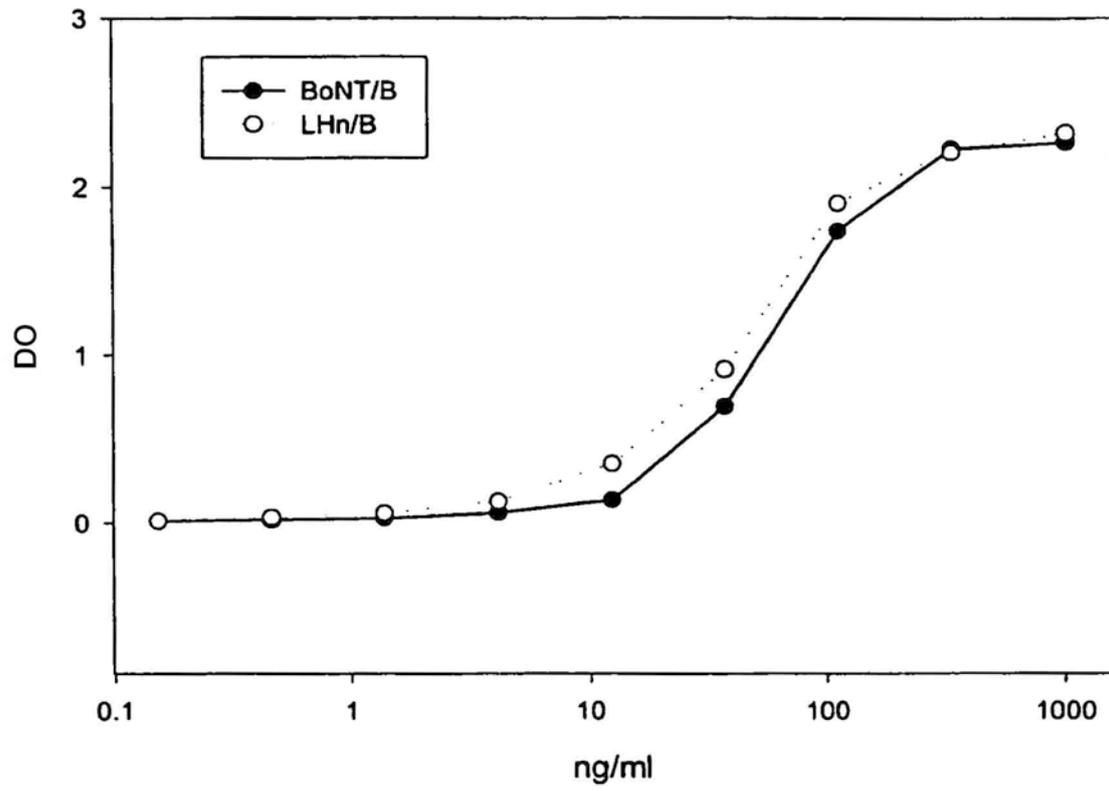


Fig. 6

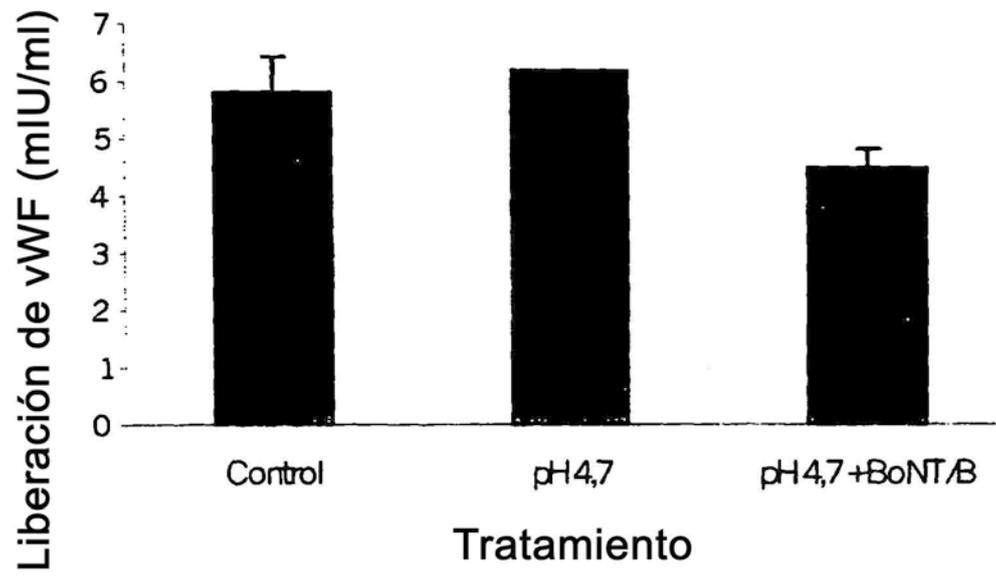


Fig. 7

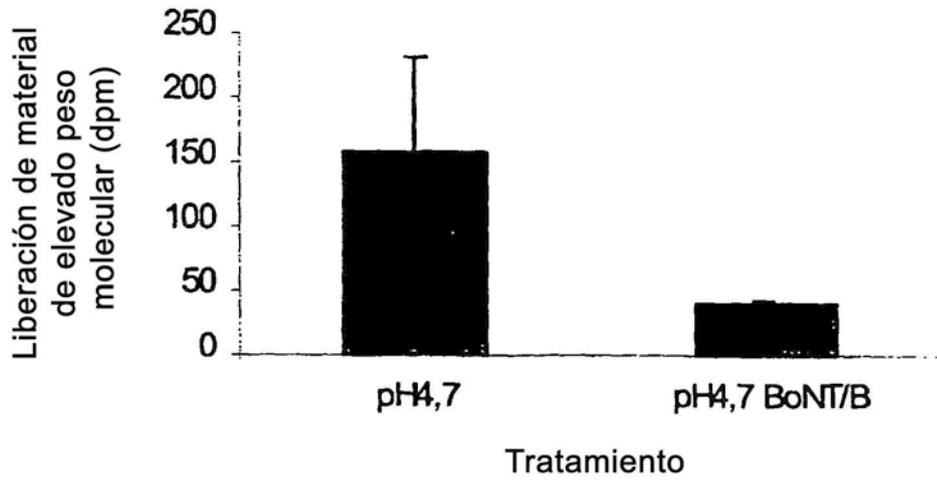


Fig. 8

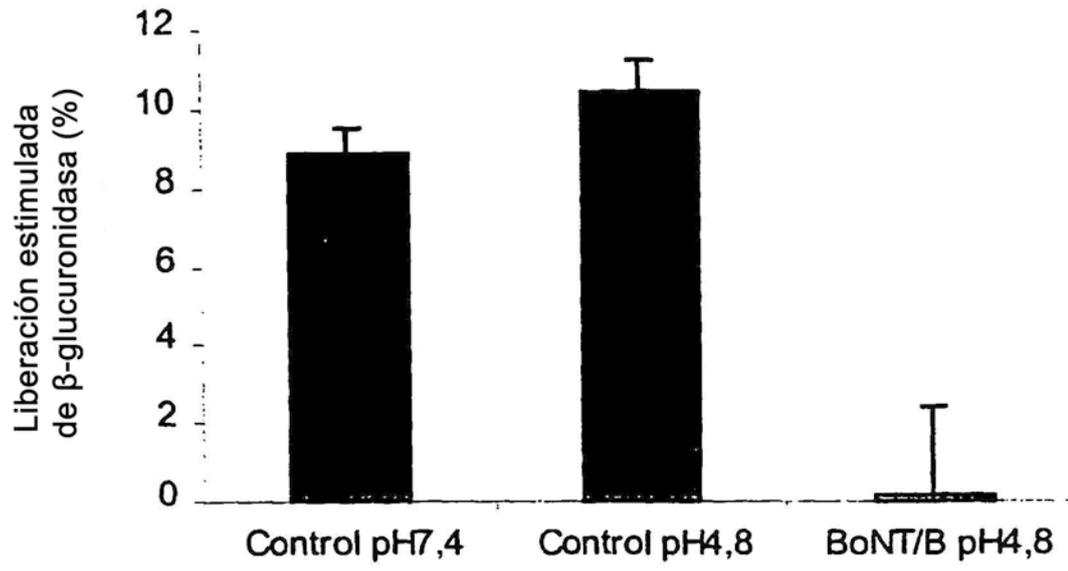


Fig. 9