

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 464 459**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/10** (2006.01)

**A61P 25/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.06.2009 E 09768854 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.03.2014 EP 2307042**

54 Título: **Modulación del sistema receptor Trpv:receptor de dominio Vps 10p para el tratamiento del dolor**

30 Prioridad:

**25.06.2008 DK 200800880**

**25.06.2008 US 75627 P**

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

**02.06.2014**

73 Titular/es:

**H. LUNDBECK A/S (100.0%)**

**Ottiliavej 9**

**2500 Valby, DK**

72 Inventor/es:

**NYKJÆR, ANDERS;**

**BJERRUM, OLE J.;**

**BJERGGAARD VÆGTER, CHRISTIAN y**

**JANSEN, PERNILLE**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 464 459 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

Modulación del sistema receptor Trpv:receptor de dominio Vps 10p para el tratamiento del dolor

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere a un procedimiento in vitro para detectar un agente que es capaz de inhibir un complejo de señalización de dolor, en el que dicho complejo es un complejo del receptor TrpV : receptor de dominio Vps10p binario, y/o un complejo ternario entre el complejo del receptor TrpV : receptor de dominio Vps10p binario y una tercera entidad, tal como, pero sin limitarse a un receptor TrkA, formando de ese modo el complejo ternario del receptor de dominio Vps10p : receptor Trpv : receptor TrkA .

**Antecedentes de la invención**

10 El dolor agudo y dolor crónico difieren en su etiología, fisiopatología, diagnóstico y tratamiento. El dolor agudo es autolimitado y cumple una función biológica protectora actuando como una advertencia del daño tisular en curso. Es un síntoma de un proceso de enfermedad experimentado en o alrededor del tejido lesionado o enfermo. El dolor agudo es nociceptivo por naturaleza, y es secundario a agentes químicos, y la estimulación térmica y mecánica de A- delta y los receptores del dolor C - polimodales.

15 Dolor crónico, por otra parte, no tiene ninguna función biológica de protección. En lugar de ser el síntoma de un proceso de enfermedad, el dolor crónico es en sí un proceso de enfermedad. El dolor crónico es implacable y no auto-limitante y como se dijo anteriormente, puede persistir durante años y hasta décadas después de la lesión inicial. El dolor crónico, no maligno es predominantemente neuropático por naturaleza e implica daños a los sistemas nerviosos central o periférico. Después de una lesión del nervio periférico (por ejemplo aplastamiento, estiramiento, o axotomía) se produce sensibilización que se caracteriza por la actividad espontánea por la neurona, un umbral menor para la activación y un aumento en la respuesta a un estímulo dado.

20 El dolor neuropático, que es el dolor iniciado o causado por una lesión primaria o disfunción en el sistema nervioso se estima que tiene una prevalencia en EE.UU. del 1,5%, es decir, en total 4 millones de personas se ven afectadas por las afecciones [1].

25 Se manifiesta como un estado crónico de hiperexcitabilidad en la parte del sistema nervioso que transmite el dolor. Existen receptores del dolor especiales llamados nociceptores recogidos en la superclase Trp del potencial receptor transitorio. Incluyen los receptores vaniloideos sensibles a la temperatura (Trpv), los canales de sensibilización de ácido y receptores mecano [2].

30 Muy por el contrario toda lesión o enfermedad en el sistema nervioso da lugar a dolor neuropático. Esta variación se debe a una predisposición genética [3]. Por lo tanto aproximadamente el 8% de las operaciones convencionales en las que se cortan nervios inevitablemente da como resultado condiciones de dolor crónico relacionado con la región de la cicatriz [4].

35 El dolor se clasifica en dolor nociceptivo, inflamatorio y neuropático [5]. El primero causado por un estímulo nocivo es de corta duración, el dolor inflamatorio es más duradero y es provocado por los mediadores inflamatorios del proceso de enfermedad que disminuyen el umbral de la percepción del dolor. El umbral se normaliza cuando se cura la inflamación. En caso de dolor neuropático, la disminución del umbral inducido por la lesión en la región afectada no vuelve a la normalidad, es por así decirlo irreversible fijado en un umbral más bajo de lo normal. Esto significa que un estímulo que no causa dolor en una persona sana puede dar lugar a la sensación de dolor en la zona afectada en un paciente. Si se siente que un estímulo por debajo de lo que una persona normal puede percibir en absoluto es doloroso, se lo llama alodinia. La hiperalgesia se utiliza para caracterizar el aumento de la intensidad de la sensación de dolor que una persona neuropática experimenta cuando se aplica un estímulo doloroso "normal" [6].

40 No existe cura causal hoy en día para las afecciones de dolor neuropático. El sistema de salud sólo puede ofrecer insuficiente alivio del dolor [1,7]. Para los analgésicos clásicos como opioides y fármacos anti-inflamatorios no esteroideos la curva de dosis-respuesta se desplaza a la derecha, lo que significa que se necesita dosis mucho más grande para el alivio del dolor [8,9]. Los anestésicos de bloqueadores de canales de Na<sup>+</sup>, tales como carbamazepina, lamotrigina y lidocaína muestran efecto cuando se administran de forma sistemática, pero producen efectos adversos graves [10,11]. El tratamiento con anticonvulsivos como gabapentina que actúa disminuyendo el influjo de Ca<sup>2+</sup> en las neuronas ha demostrado ser eficaz para amortiguar la intensidad de dolor, pero no para neutralizarlo por completo. Los antidepresivos tricíclicos median su efecto a través de un intervalo de sistemas de transmisión por ejemplo, los serotoninérgicos y noradrenérgicos. Son Actúa Los mismos actúan a nivel central y en la periferia. Son eficaces, pero el perfil de efectos adversos no es atractivo [12].

55 Por lo tanto existe una necesidad urgente de fármacos que modulan/interfieren específicamente con los procesos moleculares que regulan el nivel umbral en el tejido nervioso afectado para evitar el inicio o el desarrollo de los procesos que conducen al nivel de umbral más bajo para el dolor. Otro mecanismo podría ser constantemente suprimir los eventos moleculares que mantienen el umbral en el modo menor.

### *Analgesia*

Si mejores medicamentos tienen que ser desarrollados es necesario hacer frente a los objetivos que son centrales para la generación de dolor a través de la iniciación y regulación del nivel umbral de dolor [3].

5 La sensibilización del nivel umbral de dolor que tiene lugar a través de la inflamación e implica una larga lista de mediadores - la llamada sopa inflamatoria, que entre otros incluyen la serotonina, histamina, prostaglandinas, bradiquinina, sustancia P, péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP), factor de crecimiento nervioso (NGF) y diversas citoquinas. En relación a la lesión del nervio la neurotrofina NGF puede ser particularmente importante aunque otros mediadores también pueden participar. NGF es un miembro de la familia de neurotrofinas que comprende NGF, BDNF, NT-3 y NT-4. Las neurotrofinas pueden interactuar con el receptor no selectivo p75<sup>NTR</sup>, así como su cognato quinasa del receptor de tirosina; NGF se une preferentemente a los receptores de tirosina quinasa A (TrkA) ; BDNF y NT4 a TrkB ; y la neurotrofina 3 (NT-3) a TrkC. Generalmente se ha considerado que estas interacciones son de alta afinidad Sin embargo, en la realidad, la unión de NGF a TrkA, y de BDNF a TrkB, es de baja afinidad, pero puede ser regulada por la dimerización del receptor, modificaciones estructurales o asociación con p75<sup>NTR</sup>. El receptor p75 puede unirse a cada neurotrofina, y también actúa como un co-receptor para los receptores Trk, sortilina y otros receptores de dominio Vps10p (cf. Fig. 1).

Una vez que NGF se une, puede producirse un evento de dos etapas de TrkA: Primero, en la superficie de las neuronas sensoriales, TrkA interactúa físicamente con TrpVI, un miembro de una gran familia de canales catiónicos no selectivos permeables al calcio, que está implicado en el desarrollo de la hiperalgesia térmica inducida por la lesión de tejidos y la inflamación, y en el dolor crónico y neuropático [13]. La unión de NGF a TrkA potencia fuertemente el influjo de calcio por TrpVI y la inducción de dolor. En segundo lugar, la unión de NGF a TrkA y p75<sup>NTR</sup> también se traduce en el transporte retrógrado del complejo de nuevo al cuerpo celular de las neuronas donde el mismo modula la actividad y la transcripción de las proteínas importantes para la supervivencia y diferenciación neuronal, pero también de las enzimas y canales iónicos implicados en la transmisión nociceptiva [3,14]. También la microglia puede desempeñar un papel en esta activación [15].

25 Después de la lesión de un nervio, la cantidad de NGF disminuye en las neuronas sensoriales, pero después de un tiempo vuelve a aumentar debido a la secreción de células de Schwann, macrófagos y probablemente también debido a las propias neuronas. Esto estimula la regeneración del nervio.

Además, se ha demostrado que el proNGF, una forma precursora de NGF, interactúa con un complejo del receptor heterómero que consiste en p75<sup>NTR</sup> y Sortilina formando así un complejo ternario. A diferencia de las actividades tróficas provocadas por el NGF maduro, proNGF produce apoptosis por la formación de dicho complejo ternario a través de p75<sup>NTR</sup> y Sortilina, a menos que proNGF sea convertido en su forma madura [24].

Anteriormente [16] relacionó las neuropatías sensoriales de dolor severo con la presencia del gen TrkA en ratones. Arrett et al. (2007) [17] examinó la expresión de proNGF, sortilina y p75<sup>NTR</sup> en el ganglio radicular posterior. Encontraron que una subpoblación de neuronas coexpresaba sortilina y p75<sup>NTR</sup> y que la lesión del nervio indujo una pérdida severa de una subpoblación de pequeñas neuronas que coexpresan p75<sup>NTR</sup>-sortilina.

Por lo tanto, estas observaciones apuntan a la relación entre el desarrollo y mantenimiento de condiciones de dolor neuropático y crónico.

En la sección ejemplar de esta solicitud de patente, se demuestra evidencia experimental adicional de por qué un agente puede ser diseñado específicamente para interactuar con la cascada de señalización involucrada en el desarrollo de las condiciones de dolor neuropático que se describen en la presente memoria más arriba, a través de la interrupción de la formación de complejo del receptor.

### *Familia del receptor de dominio Vps10p*

Los presentes inventores han estudiado el efecto de la formación de modulación de un complejo de señalización de dolor, en el que dicho complejo comprende un complejo binario del receptor de dominio Vps10p: receptor TRPV o un complejo ternario del receptor de dominio Vps10p: receptor TRPV, tal como un complejo entre un receptor de dominio Vps10p, TrkA, y un receptor Trpv.

Los miembros de los receptores de dominio Vps10p son Sortilina, SorLA, SorCS1, SorCS2 y SorCS3.

### *Sortilina*

Sortilina, el miembro arquetípico de la familia del receptor de dominio Vps10p también es referido ocasionalmente como receptor Neurotensina 3 (NTR3), glucoproteína 95 (gp95) o receptor 100 kDa NT. Se accede a la Sortilina humana en virtud del ID de Proteína de Suiza No. Q99523.

Sortilina, (SEC ID N °. 1) es un receptor de membrana tipo I expresado en un número de tejidos, incluyendo el cerebro, médula espinal, testículos, músculo esquelético y hígado [18-19]. La Sortilina pertenece a una familia de receptores que comprende Sortilina, SorLA [20], SorCS1, SorCS2 y SORCS3

Todos los receptores en esta familia comparten la característica estructural de un dominio de extremo terminal N de aproximadamente 600 aminoácidos con un gran parecido a cada uno de los dos dominios que constituyen la lumina) parte del receptor de clasificación d levadura Vps10p [21]. El dominio Vps10p (Vps10p-D) que, entre otros ligandos  
 5 una factores neurotróficos y neuropéptidos [22-26], constituye la parte luminal de Sortilina (sSortilina) y se activa por la unión al ligando mediante la escisión enzimática del propéptido. Sortilina es un receptor tipo 1 multifuncional capaz de endocitosis, así como la clasificación intracelular [22, 23], y como se muestra recientemente, también participa en la señalización activando la inducción de proneurotrofina de apoptosis neuronal mediada por p75<sup>NTR</sup> [24, 25, 30, 31].  
 10 Sortilina se sintetiza como una proproteína, que se convierte en Sortilina madura por la escisión enzimática y eliminación de un propéptido N-terminal corto. Sólo el receptor maduro se une a ligandos y curiosamente, todos sus ligandos conocidos, por ejemplo, Neurotensina (NT), lipoproteína lipasa, proformas del factor 8 de crecimiento nervioso (proNGF) y factor neurotrófico derivado del cerebro (proBDNF), proteína asociada al receptor (RAP), y su propio propéptido, compiten por la unión [23-25, 28], lo que indica que los diversos ligandos se dirigen a un sitio de unión compartido o parcialmente compartido. NT es un tridecapéptido, que se une a Sortilina, SorLA y los dos receptores acoplados a proteína G NTR1 y NTR2 [22, 32-34].

#### 15 *SorLA*

El receptor relacionado con la proteína de detección SorLA (ID de proteínas de Suiza No Q92673), también conocido como LR11, es una proteína de membrana tipo 1 de 250 kDa y el segundo miembro identificado en la familia del receptor de dominio Vps10p SorLA, como sortilina, cuyo dominio luminal consiste en sólo un dominio Vps10p, se sintetiza como un proreceptor que se escinde por la furina en compartimentos de Golgi finales. Se ha demostrado  
 20 [33] que el truncamiento condiciona el dominio Vps10p para la unión inhibible al propéptido de neuropéptidos y la proteína asociada al receptor. En las células transfectadas, aproximadamente el 10% de SorLA de longitud completa se expresa en la superficie celular capaz de mediar la endocitosis. La combinación principal de receptores se encuentra en los compartimentos Golgi finales, y se ha sugerido la interacción con ligandos recién sintetizados.

#### SorCS1-3

25 Sorcs 1 (ID de proteínas de Suiza No. Q8WY21), SorCS2 (ID de proteínas de Suiza No Q96PQ0) y SORCS3 (ID de proteínas de Suiza No Q9UPU3) constituyen un subgrupo de proteínas muy similares entre sí que contienen tanto un dominio Vps10p-D y un dominio rico en leucina que bordea el dominio transmembrana [26, 38].

#### *TrkA*

30 El receptor de tirosina quinasa, neurotrófico tipo 1, también conocido como NTRK1 (ID de proteínas de Suiza No P04629) y normalmente referido como TrkA (quinasa relacionada con tropomiosina A) es un miembro de la familia del receptor de tirosina quinasa neurotrófico (NTRK). TrkA es el receptor catalítico de alta afinidad para la neurotrofina, factor de crecimiento nervioso, o "NGF". Como tal, el mismo media los múltiples efectos de NGF, que incluye la diferenciación y supervivencia neuronal: en la unión de NGF, TrkA se dimeriza y autofosforila lo que resulta en la activación de los miembros aguas abajo de la vía MAPK.

35 La presencia de TrkA conduce a la diferenciación celular y puede desempeñar un papel en la especificación de los subtipos de neuronas sensoriales. Por lo tanto las mutaciones en este gen también se han asociado a la insensibilidad congénita al dolor [39, 40, 41].

Es conocido que TrkA se asocia con TrpVI y esta interacción es esencial para la potenciación mediada por NGF de la actividad de TrpVI [42]. Los agentes conocidos con propiedades antagonistas incluyen el inhibidor de dominio  
 40 quinasa K252A.

#### TRPV1

45 El receptor de potencial transitorio vaniloide 1, TrpVI (ID de Proteína de Suiza No. Q8NER1), también conocido como receptor vaniloide o el receptor de capsaicina, es un canal catiónico regulado por ligandos no selectivo que puede ser activado por una amplia variedad de estímulos f exógenos y endógenos, incluyendo calor superior a 43°C, bajo pH, anandamida, anandamida, N-araquidonoil-dopamina y capsaicina. Los receptores TRPV1 se encuentran altamente expresados en un subconjunto de neuronas de ganglios radicales posteriores, muestran una sensibilidad mucho más alta al calor que la mayoría de los canales iónicos y están involucrados en la transmisión y modulación de dolor, así como la integración de los diversos estímulos dolorosos [43,44]

50 Los agentes antagonistas TRPV1 incluyen AMG517 (altamente selectivo se retiró de los ensayos clínicos debido a los efectos secundarios no deseados), SB-705498 y capsazepina.

#### **Compendio de la invención**

Para la preparación de un medicamento para el tratamiento de dolor en un mamífero.

En otro aspecto principal, la presente invención se refiere a al menos un agente capaz de inhibir la formación del:

- a. complejo binario del receptor de dominio Vps10p : receptor Trpv, y/o

b. complejo ternario del receptor de dominio Vps10p : TrkA : receptor Trpv complejo ternario,  
para su uso en un procedimiento para el tratamiento de dolor en un mamífero.

Aún en otro aspecto principal, la presente invención se refiere a un procedimiento para el tratamiento de dolor, donde dicho procedimiento comprende administrar a un mamífero que lo necesita, al menos un agente capaz de inhibir la formación del:

- 5
- a. complejo binario del receptor de dominio Vps10p : receptor Trpv, y/o
  - b. complejo ternario del receptor de dominio Vps10p : TrkA : receptor Trpv

En otro aspecto la presente invención se refiere a un procedimiento in vitro para detectar un agente capaz de inhibir la formación del:

- 10
- a. complejo binario del receptor de dominio Vps10p : receptor Trpv, y/o
  - b. complejo ternario del receptor de dominio Vps10p : TrkA : receptor Trpv
- que comprende las etapas de
- i. proporcionar un receptor de dominio Vps10p y un receptor Trpv, o
  - ii. proporcionar un receptor de dominio Vps10p y un receptor Trpv y un receptor TrkA, y
  - 15 iii. proporcionar una biblioteca de agentes potenciales, y
  - iv. proporcionar un ensayo para medir la unión de una primera entidad receptor de dominio Vps10p a una segunda entidad receptor Trpv, o
  - v. proporcionar un ensayo para medir la unión de una primera entidad receptor Trpv a una segunda entidad receptor de dominio Vps10p, o
  - 20 vi. proporcionar un ensayo para medir la unión de una primera entidad receptor Trpv a una segunda entidad complejo binario (receptor de dominio Vps10p : receptor TrkA), o
  - vii. proporcionar un ensayo para medir la unión de una primera entidad complejo binario (receptor de dominio Vps10p : receptor TrkA) a una segunda entidad receptor Trpv, o
  - viii. proporcionar un ensayo para medir la unión de una primera entidad receptor de dominio Vps10p a una segunda entidad complejo binario (TrpV : receptor TrkA), o
  - 25 ix. proporcionar un ensayo para medir la unión de una primera entidad complejo binario (TrpV : receptor TrkA) a una segunda entidad receptor de dominio Vps10p, o
  - x. proporcionar un ensayo para medir la unión de una primera entidad receptor TrkA a una segunda entidad complejo binario (TrpV : Receptor del dominio Vps10p), o
  - 30 xi. proporcionar un ensayo para medir la unión de una primera entidad complejo binario (TrpV : receptor de dominio Vps10p) a una segunda entidad receptor TrkA, y
  - xii. añadir la biblioteca de agentes potenciales que deben ser ensayados al ensayo seleccionado de iv a xi, y
  - xiii. determinar la cantidad de dicha primera entidad a dicha segunda entidad, y
  - xiv. comparar la cantidad determinada en la etapa xiv) con una cantidad medida en ausencia del agente que debe ser ensayado,
  - 35 xv. en el que la diferencia en las dos cantidades identifica un agente que altera la unión de la primera entidad a la segunda entidad.

### **Perspectiva general de los dibujos**

Figura 1: perspectiva general del receptor

40 Figura 2: interacciones físicas de los receptores - coimmunoprecipitaciones.

Figura 3: Interacciones físicas de los receptores – esquemática

Figura 4: Datos estereológicos e inmunofluorescencia de DRG

Figura 5a-b: placa caliente y retirada de cola

Figura 5c: ensayo de von Frey

Figura 6: Dolor neuropático en el modelo animal de Lesión con Nervio Preservado.

Figura 7a-b: Dolor neuropático en el modelo animal de Ligadura del Nervio Espinal

5 Figura 8: datos de unión BIACORE para los agentes de la invención

### Descripción detallada de la invención

#### Definiciones

Dolor agudo: dolor que aparece rápidamente, puede ser grave, pero dura un tiempo relativamente corto en oposición al dolor crónico.

10 Adyuvante: Cualquier sustancia cuya mezcla con un determinante inmunogénico/antígeno administrado aumenta o modifica de otro modo la respuesta inmune a dicho determinante.

Afinidad: La interacción de la mayoría de los ligandos con sus en sitios de unión puede caracterizarse en términos de una afinidad de unión. En general, la unión de los ligandos de alta afinidad resultada de mayor fuerza intermolecular entre el ligando y su receptor mientras que la unión del ligando de baja afinidad implica menos fuerza intermolecular entre del ligando y su receptor. En general, la unión de alta afinidad implica un tiempo de residencia más largo para el ligando en su sitio de unión al receptor que en el caso para la unión de baja afinidad. La unión de alta afinidad de ligandos a los receptores es a menudo fisiológicamente importante cuando algo de la energía de unión se puede utilizar para provocar un cambio conformacional en el receptor, lo que resulta en comportamiento alterado de un canal de iones asociado o enzima.

20 Un ligando que puede unirse a un receptor, alterar la función del receptor y desencadenar una respuesta fisiológica se llama un agonista para ese receptor. Unión a un receptor agonista puede caracterizarse tanto en términos de cuánto se puede activar la respuesta fisiológica y en términos de la concentración del agonista que se requiere para producir la respuesta fisiológica. La unión de alta afinidad al ligando implica que una concentración relativamente baja de un ligando es adecuada para ocupar al máximo un sitio de unión a ligando y desencadenar una respuesta fisiológica. Unión de baja afinidad implica que se requiere una concentración relativamente alta de un ligando antes de que el sitio de unión está ocupado máximo y se consigue la máxima respuesta fisiológica al ligando. La unión del ligando a menudo se caracteriza en términos de la concentración de ligando a la que la mitad de los sitios de unión a receptores están ocupados, conocida como la constante de disociación ( $K_d$ ). La afinidad también es la resistencia de la unión entre los receptores y sus ligandos, por ejemplo entre un anticuerpo y su antígeno.

30 Alcohol: Una clase de compuestos orgánicos que contienen uno o más grupos hidroxilo (OH). En este contexto un grupo hidrocarburo saturado o insaturado, ramificado o no ramificado que está situado como un sustituyente en una molécula más grande.

Grupo alicíclico: el término "grupo alicíclico" significa un grupo hidrocarburo cíclico que tiene propiedades parecidas a las de los grupos alifáticos.

35 Grupo alifático: en el contexto de la presente invención, el término "grupo alifático" significa un grupo hidrocarburo ramificado lineal saturado o insaturado. Este término se usa para abarcar grupos alquilo, alquenilo, y alquinilo, por ejemplo.

Grupo alquilo: El término "grupo alquilo" significa un grupo hidrocarburo ramificado o lineal saturado incluyendo, por ejemplo, metilo, etilo, isopropilo, t-butilo, heptilo, dodecilo, octadecilo, amilo, 2-etilhexilo, y similares.

40 Grupo alquenilo: el término "grupo alquenilo" significa un grupo hidrocarburo ramificado o lineal insaturado con uno o más enlaces dobles carbono-carbono, tal como un grupo vinilo.

Alquinilo grupo: el término "grupo alquinilo" significa un grupo hidrocarburo ramificado o lineal insaturado con uno o más enlaces triples carbono-carbono.

Anfifilo: sustancia que contiene ambos grupos polares, solubles en agua y no polares insolubles en agua.

45 Agonista: Un agonista es un compuesto capaz de incrementar o afectar la actividad de un receptor. Especialmente, un agonista del receptor de dominio Vps10p es un compuesto capaz de unirse a uno o más de los sitios de unión de un receptor de dominio Vps10p induciendo de ese modo la misma respuesta fisiológica que un compuesto ligando de agonista endógeno dado. Análogamente, los agonistas Trpv y TrkA son compuestos capaces de unirse a uno o más de los sitios de unión de un receptor Trpv y TrkAs induciendo de ese modo la misma respuesta fisiológica que un compuesto ligando agonista endógeno determinado.

50

Antagonista : Un antagonista es en este caso sinónimo de un inhibidor. Un antagonista es un compuesto capaz de disminuir la actividad de un efector tal como un receptor. En concreto, un antagonista del un receptor de dominio Vps10p es un compuesto capaz de unirse a uno o más de este sitios de unión del receptor de dominio Vps10p inhibiendo de ese modo la unión de otro ligando de este modo inhibiendo una respuesta fisiológica. Análogamente, los antagonistas TRPV y TrkA son compuestos capaces de unirse a uno o más de estos sitios de unión de los receptores Trpv y TrkAs inhibiendo de ese modo la respuesta fisiológica del compuesto ligando agonista.

ARN antisentido : una molécula de ARN capaz de hacer que el gen se silencie específicamente uniéndose a una molécula de ARNm de interés .

ADN antisentido : una molécula de ADN capaz de hacer que el gen se silencie específicamente uniéndose a una molécula de ARNm de interés .

Anticuerpo : El término "anticuerpo" según lo referido en la presente memoria incluye anticuerpos completos y cualquier fragmento de unión a antígeno (es decir, "porción de unión a antígeno") o cadena simple del mismo.

"Un anticuerpo completo" se refiere a una glicoproteína que comprende al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas livianas (L) interconectadas por enlaces disulfuro, o una porción de unión al antígeno del mismo. Cada cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada (abreviada en la presente memoria como V<sub>H</sub>) y una región constante de cadena pesada (abreviada en presente la memoria como C<sub>H</sub>). Cada cadena liviana está compuesta por una región variable de cadena liviana (abreviada en la presente memoria como V<sub>L</sub>) y una región constante de cadena liviana (abreviada en la presente memoria como C<sub>O</sub>). Las regiones V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> pueden ser subdivididas en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones de determinación de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco (FR). Cada V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> está compuesta de tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el extremo terminal amino al extremo terminal carboxi en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las regiones variables de las cadenas livianas y pesadas contienen un dominio de unión que interacciona con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar la unión de la inmunoglobulina en tejidos o factores del huésped, incluyendo varias células del sistema inmune (por ejemplo, células efectoras) y el componente de imprimación (C1 q) del sistema clásico del complemento.

El término "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo, como se emplea en la presente memoria, se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que retienen la capacidad de unirse específicamente a un anticuerpo antígeno. Se ha demostrado que la función de unión a antígeno de un anticuerpo puede ser realizada por fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Los ejemplos de fragmentos de unión contemplados dentro de la expresión "porción de unión al antígeno" de un anticuerpo incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios V<sub>L</sub>, V<sub>H</sub>, C<sub>L</sub> y C<sub>H</sub>; (ii) un fragmento F(ab')<sub>2</sub>, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste en los dominios V<sub>H</sub> y C<sub>H</sub>; (iv) un fragmento Fv que consiste en los dominios V<sub>L</sub> y V<sub>H</sub> de un único brazo de un anticuerpo, (v) un fragmento dAb (Ward *et al.*, (1989) *Nature* 341:544-546), que consiste en un dominio V<sub>H</sub>; (vi) una región de determinación de complementariedad aislada (CDR ), y (vii) una combinación de dos o más CDR aisladas que pueden opcionalmente estar unidas por un acoplador sintético. Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, V<sub>L</sub> y V<sub>H</sub>, están codificados por genes separados, pueden unirse, utilizando procedimientos recombinantes, por un acoplador sintético que les permite ser como una cadena de proteína simple en la que el par de regiones V<sub>L</sub> y V<sub>H</sub> para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv de cadena simple (scFv) ; véase, por ejemplo, Bird *et al.* (1988) *Science* 242:423-426; y Huston *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883). Dichos anticuerpos de cadena simple también están destinados a estar comprendidos dentro de la expresión "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo.

Un ejemplo adicional de un dominio de unión a antígeno es las proteínas de fusión con inmunoglobulina que comprenden (i) un polipéptido de dominio de unión que está fusionado a un polipéptido de región de bisagra de inmunoglobulina, (ii) una región constante CH<sub>2</sub> de cadena pesada de inmunoglobulina fusionada a la región bisagra, y (iii) una región constante CH<sub>3</sub> de cadena pesada de inmunoglobulina fusionada a la región constante CH<sub>2</sub>. El polipéptido de dominio de unión puede ser una región variable de cadena pesada o una región variable de cadena liviana. Tales proteínas de fusión de inmunoglobulina de dominio de unión también se describen en US 2003/0118592 y US 2003/0133939.

Estos Fragmentos de anticuerpo se obtienen utilizando técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica, y los fragmentos son seleccionados para la utilidad de la misma manera que los anticuerpos intactos .

El término "epítipo" significa un determinante de proteína capaz de unirse a un anticuerpo específico. Los epítipos normalmente consisten en agrupaciones superficiales químicamente activas de moléculas tal como aminoácidos o cadenas laterales de azúcares y por lo general tienen tres características estructurales de dimensión específicas, así como características de carga específicas. Los epítipos conformacionales y no conformacionales se distinguen en que la unión al primero, pero no el último se pierde en presencia de disolventes desnaturizantes.

El término "epítipo discontinuo" como se emplea en la presente memoria, significa un epítipo conformacional de un

antígeno proteico que está formado de al menos dos regiones separadas en la secuencia primaria de la proteína. Un epítipo discontinuo también puede estar formado por al menos dos regiones de una o más proteínas, en tal caso, el antígeno puede estar formado por una o más proteínas .

5 El término "molécula biespecífica" pretende incluir cualquier agente, por ejemplo, una proteína, péptido, o proteína o complejo de péptido, que tiene dos especificidades de unión diferentes. Por ejemplo, la molécula puede unirse a, o interactuar con, (a) un antígeno de superficie celular y (b) un receptor Fc sobre la superficie de una célula efectora. El término "molécula multiespecífica" o "molécula heteroespecífica" pretende incluir cualquier agente, por ejemplo, una proteína, péptido, o complejo proteico o peptídico, que tiene más de dos especificidades de unión diferentes. Por ejemplo, la molécula puede unirse a, o interactuar con, (a) un antígeno de superficie celular, (b) un receptor Fc sobre la superficie de una célula efectora, y (c) al menos otro componente. Por consiguiente, La Invención incluye, pero no se limita a, moléculas biespecíficas, trispecíficas, tetraspecíficas, y otras moléculas multiespecíficas que se dirigen al epítipo CAOU - 1, y a otros antígenos o dianas de la superficie celular, tal como receptores Fc en células efectoras.

15 Como se emplea en la presente memoria, un anticuerpo humano se "obtiene de" un secuencia de línea germinal particular, si el anticuerpo se obtiene a partir de un sistema utilizando secuencias de inmunoglobulina humana, por ejemplo, mediante la inmunización de un ratón transgénico portador de genes de inmunoglobulina humana o por detección de una biblioteca de genes de inmunoglobulina humana, y en el que el anticuerpo humano seleccionado es al menos 90%, más preferentemente al menos 95%, incluso más preferentemente al menos 96%, 97%, 98%, o 99% idéntico en la secuencia de aminoácidos respecto de la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de la línea germinal. Típicamente, un anti-cuerpo humano obtenido de una secuencia de la línea germinal humana en particular mostrará no más de diferencias de 10 aminoácidos, más preferentemente, no más de 5 o incluso más preferentemente, no más de una diferencia de 4, 3, 2 ó 1 aminoácidos de la secuencia de aminoácidos codificados por el gen de la inmunoglobulina de la línea germinal.

25 El término "anticuerpo humano", como se emplea en la presente memoria, se pretende que incluya anticuerpos que tienen regiones constantes y variables obtenidos de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. Los anticuerpos humanos de la invención pueden incluir residuos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana (por ejemplo, las mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica del sitio in vitro o por mutación somática in vivo). Sin embargo, el término "anticuerpo humano", como se emplea en la presente memoria, no pretende incluir anticuerpos en los que las secuencias CDR obtenidas de la línea germinal de otra especie de mamífero, tal como un ratón, han sido injertados en secuencias marco humanas.

30 El término "anticuerpo recombinante humano", como se emplea en la presente memoria, incluye todos los anticuerpos humanos que se preparan, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes, tal como (a) anticuerpos aislados de un animal (por ejemplo, un ratón) que es transgénico o transcromosomal para genes de inmunoglobulina humana o un hibridoma preparado a partir del mismo, (b) anticuerpos aislados de una célula huésped transformada para expresar el anticuerpo, por ejemplo, de un transfectoma, (c) anticuerpos aislados de una biblioteca de anticuerpos humanos combinatoriales, recombinantes, y (d) anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados por cualquier otro medio que implica el empalme de secuencias de genes de inmunoglobulina humana con otras secuencias de ADN. Tales anticuerpos humanos recombinantes tienen regiones constantes y variables derivadas de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana.

40 En ciertas formas de realización, sin embargo, tales anticuerpos humanos recombinantes pueden ser sometidos a mutagénesis in vitro (o, cuando se usa un animal transgénico para secuencias de Ig humana, mutagénesis somática in vivo) también llamada maduración de afinidad y por lo tanto las secuencias de aminoácidos de la regiones V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, aunque se obtienen de y están relacionadas con las secuencias V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> de la línea germinal humana, no pueden existir de forma natural dentro de repertorio de la línea germinal de anticuerpos humanos in vivo

45 Como se emplea en la presente memoria, un "anticuerpo heterólogo" se define con relación al organismo no humano transgénico que produce dicho anticuerpo. Este término se refiere a un anticuerpo que tiene una secuencia de aminoácidos o una secuencia de ácidos nucleicos codificante correspondiente a la encontrada en un organismo que o consiste en el animal no humano transgénico, y por lo general a partir de una especie diferente a la del animal no humano transgénico

50 Un "anticuerpo aislado", como se emplea en la presente memoria, pretende referirse a un anticuerpo que está sustancialmente libre de otros anticuerpos que tienen diferentes especificidades antigénicas (por ejemplo, un anticuerpo aislado que se une específicamente al epítipo CAOU-1 está sustancialmente libre de anticuerpos que se unen específicamente a antígenos distintos del epítipo CAOU-1). Un anticuerpo aislado que se une específicamente a un epítipo, isoforma o variante del epítipo CAOU-1 humano puede, sin embargo, tener una reactividad cruzada con otros antígenos relacionados, por ejemplo, de otras especies (por ejemplo, homólogos de especies de epítipo CAOU-1). Además, un anticuerpo aislado puede estar sustancialmente libre de otro material celular y/o productos químicos.

Como se emplea en la presente memoria, "unión específica" se refiere a la unión del anticuerpo a un antígeno

- predeterminado. Típicamente, el anticuerpo se une con una afinidad correspondiente a un  $K_D$  de aproximadamente  $10^{-7}$  M o menos, tal como aproximadamente  $10^{-8}$  M o menos, tal como aproximadamente  $10^{-9}$  M o menos, aproximadamente  $10^{-10}$  M o menos, o aproximadamente  $10^{-11}$  M o incluso menos, cuando se mide como afinidades aparentes en base a los valores de  $IC_{50}$  en FACS, y se une al antígeno predeterminado con una afinidad correspondiente a un  $K_D$  que es al menos diez veces menor, tal como al menos 100 veces inferior a su afinidad para unirse a un antígeno no específico (por ejemplo, BSA, caseína) distinto del antígeno predeterminado o un antígeno estrechamente relacionado.
- 5
- Avidez: La fuerza de combinación funcional de un anticuerpo con su antígeno que está relacionada tanto con la afinidad de la reacción entre los epítomos y paratopes, y las valencias del anticuerpo y antígeno.
- 10
- Clases de anticuerpos: Dependiendo de las secuencias de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas, las inmunoglobulinas pueden asignarse a diferentes clases. Hay al menos cinco (5) clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de estas pueden dividirse además en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG-1, IgG-2, IgG-3 y de IgG-4; IgA-1 e IgA-2. Los dominios constantes de cadenas pesadas que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan alfa (a), delta (s), épsilon (s), gamma (y) y mu ( $\mu$ ), respectivamente. Las cadenas livianas de anticuerpos pueden ser asignadas a uno de dos tipos claramente distintos, denominados kappa ( $\kappa$ ) y lambda ( $\lambda$ ), en base a las secuencias amino de su dominio constante. Las estructuras de las subunidades y las configuraciones tridimensionales de diferentes clases de inmunoglobulinas son bien conocidas.
- 15
- Sitio de combinación de anticuerpos: Un sitio de combinación de anticuerpos es aquella porción estructural de una molécula de anticuerpo compuesta por regiones hipervariables y variables de cadena liviana y pesada y que se une específicamente a (inmunorreacciona con) un antígeno. El término inmunorreacciona en sus diversas formas significa la unión específica entre una molécula que contiene un determinante antigénico y una molécula que contiene un sitio de combinación de anticuerpos tal como una molécula de anticuerpo completa o una parte de la misma. Como alternativa, un sitio de combinación de anticuerpos se conoce como un sitio de unión de antígenos.
- 20
- Anticuerpo quimérico: Un anticuerpo en el que las regiones variables son de una especie animal y las regiones constantes son de otra especie de animal. Por ejemplo un anticuerpo quimérico puede ser un anticuerpo que tiene regiones variables que se obtienen de anticuerpo monoclonal de ratón y regiones constantes que son humanas.
- 25
- Región de determinación de complementariedad o CDR: Regiones, en los dominios V de un anti-cuerpo que en conjunto forman el dominio de unión y reconocimiento de anticuerpos.
- 30
- Región constante o dominio constante o dominio C: las regiones constantes son aquellas porciones estructurales de una molécula de anticuerpo que comprende secuencias de residuos de aminoácidos dentro de un isotipo dado que puede contener sustituciones conservadoras en el mismo. Las regiones constantes de cadena pesada de inmunoglobulina ejemplares son aquellas porciones de una molécula de inmunoglobulina conocida en la técnica como CH1, CH2, CH3, CH4 y CH5. Una región constante de inmunoglobulina de cadena liviana es aquella parte de una molécula de inmunoglobulina conocida en la técnica como  $C_L$ .
- 35
- Diacuerpos: Este término se refiere a pequeños fragmentos de anticuerpos con dos sitios de unión a antígenos, dichos fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada ( $V_H$ ) conectado a un dominio variable de cadena liviana ( $V_L$ ) en la misma cadena de polipéptidos ( $V_H-V_L$ ). Utilizando un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, los dominios son forzados a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena y crear dos -sitios de la unión a antígenos. Los diacuerpos se describen más completamente en, por ejemplo, EP 404,097; WO 93/11161; y Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448 (1993).
- 40
- Fv: fragmento de anticuerpo de cadena doble que contiene tanto un  $V_H$  como un  $V_L$ .
- 45
- Marco de anticuerpo humano: Una molécula que tiene un sitio de unión a antígeno y esencialmente todas las partes derivadas de inmunoglobulina restantes de la molécula derivada de una inmunoglobulina humana.
- Marco de anticuerpo humanizado: Una molécula que tiene un sitio de unión a antígeno obtenido de una inmunoglobulina de una especie no humana, mientras que algunas o todas las partes derivadas de inmunoglobulina restantes de la molécula se obtienen de una inmunoglobulina humana. El sitio de unión a antígenos puede comprender o bien un dominio de variable completo de la inmunoglobulina no humana fusionada en uno o más dominios contantes humanos; o una o más de las regiones de determinación de complementariedad (CDRs) injertadas en regiones marco humanas apropiadas en el dominio variable. En un anticuerpo humanizado, los CDRs pueden ser de un anticuerpo monoclonal de ratón y las otras regiones del anticuerpo son humanas.
- 50
- Inmunoglobulina: Los anticuerpos en suero, incluyendo IgG, IgM, IgA, IgE y IgD.
- 55
- Isotipos de Inmunoglobulina: nombres dados a Ig que tienen diferentes cadenas H, los nombres son IgG (IgG<sub>1, 2, 3, 4</sub>), IgM, IgA (IgA<sub>1, 2</sub>), SIGA, IgE, IgD.

Inmunológicamente distintos: La frase inmunológicamente distintos se refiere a la capacidad de distinguir entre dos polipéptidos en la capacidad de un anticuerpo para unirse específicamente a uno de los polipéptidos y no unirse específicamente al otro polipéptido.

5 Anticuerpo Monoclonal: la frase anticuerpo monoclonal en sus diversas formas gramaticales se refiere a una población de moléculas de anticuerpo que contiene sólo una especie de sitio de combinación de anticuerpos capaz de inmunoreaccionar con un antígeno particular. Un anticuerpo monoclonal por lo tanto presenta típicamente una sola afinidad de unión para cualquier antígeno con el que inmunorreacciona. Un anticuerpo monoclonal puede contener una molécula de anticuerpo que tiene una pluralidad de sitios de combinación de anticuerpo, cada uno inmuno-específico para un antígeno diferente, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal biespecífico.

10 Anticuerpo policlonal: Los anticuerpos policlonales son una mezcla de moléculas de anticuerpos que reconocen un determinado antígeno específico, por lo tanto, los anticuerpos policlonales pueden reconocer diferentes epítopos dentro de dicho antígeno.

15 Anticuerpo de cadena simple o scFv: La frase anticuerpo de cadena simple se refiere a un único polipéptido que comprende uno o más sitios de unión antígenos, por lo general un sitio de unión a antígeno. Además, aunque las cadenas H y L de un fragmento Fv están codificadas por genes separados, las mismas pueden estar ligadas ya sea directamente o a través de un péptido, por ejemplo se puede fabricar un enlazador sintético que les permita que sean una sola cadena de proteína (conocida como anticuerpo de cadena simple, Abs; Bird et al 1988 Ciencia 242:423-426; y Huston et al 1988 PNAS 85:5879-5883) mediante procedimientos recombinantes. Tales anticuerpos de cadena simple también están contemplados dentro del término "anticuerpo", y pueden utilizarse como determinantes de unión en el diseño y la ingeniería de una molécula de unión de unión multiespecífica.

20 Valencia: El término valencia se refiere al número de potenciales sitios de unión antigénicos, es decir, los dominios de unión, en un polipéptido. Un polipéptido puede ser monovalente y puede contener un sitio de unión a antígeno o un polipéptido puede ser bivalente y contener dos sitios de unión a antígeno. Además, un polipéptido puede ser tetravalente y contener cuatro sitios de unión a antígeno. Cada sitios de unión a antígeno se une específicamente a un antígeno. Cuando un polipéptido comprende más de un sitios de unión a antígeno, cada sitios de unión a antígeno puede unirse específicamente a antígenos iguales o diferentes. Por lo tanto, un polipéptido puede contener una pluralidad de estos sitios de unión a antígenos y por tanto, ser multivalente y un polipéptido puede unirse específicamente a antígenos iguales o diferentes.

25 Dominio V: dominio variable son las partes estructurales de una molécula de aminoácido que comprende secuencias de residuos de aminoácidos que forman sitios de unión a antígenos. Una región variable de inmunoglobulina de cadena liviana ejemplar es la porción de una molécula de inmunoglobulina conocida en la técnica como V<sub>L</sub>.

V<sub>L</sub>: dominio variable de cadena ligera.

V<sub>H</sub>: dominio variable de cadena pesada.

30 Apoptosis: La apoptosis es un proceso de suicidio por parte de una célula en un organismo multicelular. Es uno de los principales tipos de muerte celular programada (PCD), y supone una serie orquestada de eventos bioquímicos que conducen a una característica morfología celular y la muerte.

Inhibidor de apoptosis: Cualquier compuesto capaz de disminuir el proceso de apoptosis.

Grupo aromático: el término "grupo aromático" o "grupo arilo" significa un grupo hidrocarburo aromático mono o policíclico.

40 Unión: El término "unión" o "asociado con" se refiere a una condición de proximidad entre entidades químicas o compuestos, o porciones de los mismos. La asociación puede ser no covalente - en la que la yuxtaposición está energéticamente favorecida por enlaces de hidrógeno o de van der Waals o interacciones electrostáticas -o puede ser covalente.

45 Sitio de unión: El término "sitio de unión" o "bolsillo de unión", como se emplea en la presente memoria, se refiere a una región de una molécula o complejo molecular que, como resultado de su forma, se asocia favorablemente con otra molécula, complejo molecular, entidad química o compuesto. Como se emplea en la presente memoria, el bolsillo comprende al menos una cavidad profunda y, opcionalmente, una cavidad superficial.

50 Sitio de unión 1 de Sortilina: Un sitio de unión de alta afinidad de neurotensina o como sinónimo sitio de unión 1 es un sitio de unión de sortilina (SEC ID NO. 1) que tiene alta afinidad para la neurotensina o un fragmento o variante de neurotensina, y que tiene afinidad para el propéptido sortilina o un fragmento del mismo (Residuos de aminoácidos 34-77 de SEC ID NO. 1) comprendiendo dicho sitio de unión los residuos de aminoácidos R325, S316, Y351, I353, K260, I327, F314, F350 a M363, S305, F306, T398 a G400, I303-G309, Q349-A356, Y395 y T402 de SEC ID NO. 1. Más preferentemente, el sitio de unión 1 comprende los aminoácidos R325, S316, Y351, I353, K260, I327, F314, F350 a M363, S305, F306 y T398 a G400 de SEC ID NO. 1. Mucho más preferentemente el sitio de unión 1 de sortilina comprende los aminoácidos R325, S316, Y351, I353, K260, I327, F314 y F350 a M363 de SEC

55

ID NO. 1. El sitio de unión 1 es un sitio de unión promiscuo.

Sitio de unión 2 de Sortilina: A sitio de unión de sortilina que tiene baja afinidad para neurotensina o un fragmento o variante de neurotensina, comprendiendo dicho sitio de unión los residuos de aminoácidos L572, L114, V112, R109 a S111, S115 a G118, T570, G571, W586, W597, T168-1174, L572, A573 y S584 a F588 de SEC ID NO. 1. Más preferentemente el sitio de unión de baja afinidad a sortilina de neurotensina comprende los aminoácidos L572, L114, V112, R109 a S111, S115 a G118, T570, G571, W586 y W597 de SEC ID NO. 1. Mucho más preferentemente el sitio de unión de baja afinidad a sortilina de neurotensina comprende los aminoácidos L572, L114 y V112. El sitio de unión 2 es promiscuo y puede unirse al propéptido de Sortilina (residuos de aminoácidos 34-77 de SEC ID NO. 1).

Sitio de unión 3 de Sortilina: Un sitio de unión promiscuo de sortilina que comprende los residuos de aminoácidos D403, S420, D422, N423, S424, I425, E426, E444, T451, Y466, E470, I498, S499 y V500 de SEC ID NO. 1, más preferentemente que comprende los residuos de aminoácidos D403, N423, S424, I425, T451, Y466, I498 y V500 de SEC ID NO. 1, mucho más preferentemente que comprende los residuos de aminoácidos T451, Y466, I498 y V500 de SEC ID NO. 1.

Agente bioactivo: término "agente bioactivo" como se emplea en la presente memoria se refiere a cualquier sustancia que puede ser utilizada en conexión con una aplicación que sea terapéutica o diagnóstica, tal como, por ejemplo, en los procedimientos para diagnosticar la presencia o ausencia de una enfermedad en un paciente y/o procedimientos para el tratamiento de una enfermedad en un paciente. "Agente bioactivo" se refiere a sustancias, que son capaces de ejercer un efecto biológico in vitro y/o in vivo. Los agentes bioactivos pueden ser neutros, con carga positiva o negativa. Los agentes bioactivos adecuados incluyen, por ejemplo profármacos, agentes de diagnóstico, agentes terapéuticos, agentes farmacéuticos, fármacos, agentes de suministro de oxígeno, sustitutos de la sangre, moléculas orgánicas sintéticas, polipéptidos, péptidos, vitaminas, esteroides, análogos de esteroides y determinantes genéticos, incluyendo nucleósidos, nucleótidos y polinucleótidos.

Grupo catiónico: un grupo químico capaz de funcionar como un dador de protones cuando un compuesto que comprende el grupo químico se disuelve en un disolvente, preferiblemente cuando se disuelve en agua.

Dolor crónico: Dolor (una sensación desagradable de malestar) que persiste o evoluciona durante un largo período de tiempo. En contraste con el dolor agudo que surge de repente en respuesta a una lesión específica y es generalmente tratable, el dolor crónico persiste en el tiempo y es a menudo resistente a los tratamientos médicos.

El dolor crónico puede estar relacionado con una serie de diferentes afecciones médicas incluyendo (pero sin limitarse a) diabetes, artritis, migraña, fibromialgia, cáncer, herpes zóster, ciático, trauma anterior y o lesión. El dolor crónico puede empeorar como respuesta a factores ambientales y/o psicológicos. Actualmente una gran variedad de opciones de tratamiento están disponibles para las personas con dolor crónico. El objetivo de la gestión de dolor es proporcionar el alivio de los síntomas y mejorar el nivel de funcionamiento de una persona en las actividades diarias. Varios tipos de medicamentos se han utilizado en el tratamiento del dolor crónico, incluyendo acetaminofeno, ibuprofeno, aspirina, inhibidores de COX-2, medicamentos antimigraña, sedantes, opiáceos y antidepresivos. Estos medicamentos se pueden administrar conjuntamente junto con el medicamento de la presente invención.

Tratamientos no medicinales para el dolor crónico pueden incluir ejercicios, terapia física, asesoramiento, estimulación eléctrica, biorretroalimentación, acupuntura, hipnosis, medicina quiropráctica y otros tratamientos que también se pueden combinar con el tratamiento con agentes de la presente invención.

Complejo: Como se emplea en la presente memoria el término "complejo" se refiere a la combinación de una molécula o una proteína, análogos de conservantes o truncamientos del mismo asociados con una entidad química. Específicamente la presente invención se refiere a un complejo binario entre un receptor de dominio Vps10p y un receptor Trpv en el que dicho complejo binario opcionalmente puede unirse a un componente del tercer receptor, pero sin limitarse a un receptor TrkA o un fragmento o variante del mismo. Los inventores han encontrado que el complejo binario y ternario mencionados anteriormente están involucrados en la transducción de señales de dolor los cuales pueden ser limitados o abolidos inhibiendo la formación de dicho complejo binario o ternario.

Coordenada El término "coordenada" como se emplea en la presente memoria, se refiere a la información de la organización tridimensional de los átomos que contribuyen a la estructura de una proteína. El mapa final que contiene las coordenadas atómicas de los constituyentes del cristal pueden ser almacenadas en un vehículo de datos; normalmente los datos se almacenan en formato PDB o en formato mmCIF, ambos de los cuales son conocidos por la persona experta en la técnica. Sin embargo, las coordenadas del cristal también pueden almacenarse en tablas simples o formatos de texto. El formato PDB está organizado de acuerdo a las instrucciones y directrices dadas por el Research Col-laboratory para la Biología Estructural

Grupo cíclico: el término "grupo cíclico" significa un grupo hidrocarburo anular cerrado que se clasifica como un grupo alicíclico, grupo aromático o grupo heterocíclico.

Cicloalqueno: significa un radical carbocíclico insaturado monovalente que consiste en uno, dos o tres anillos, de tres a ocho carbonos por anillo, que puede opcionalmente estar sustituido con uno o dos sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en hidroxilo, ciano, alqueno inferior, alcoxi inferior, haloalcoxi inferior, alqueno inferior,

halo, haloalqueno, hidroxialqueno, nitro, alcoxicarbono, amino, alquenoilamino, alquenoilsulfonilo, arilsulfonilo, alquenoilaminosulfonilo, arilaminosulfonilo, alquilsulfonilamino, arilsulfonilamino, alquenoilaminocarbonilo, arilaminocarbonilo, alquenoilcarbonilamino y arilcarbonilamino.

- 5 Cicloalquilo: significa un radical carbocíclico saturado monovalente que consiste en uno, dos o tres anillos, de tres a ocho carbonos por anillo, que puede opcionalmente estar sustituido con uno o dos sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en hidroxilo, ciano, alquilo inferior, alcoxi inferior, haloalcoxi inferior, alquiltio, halo, haloalquilo, hidroxialquilo, nitro, alcoxicarbonilo, amino, alquilamino, alquilsulfonilo, arilsulfonilo, alquilaminosulfonilo, arilaminosulfonilo, alquilsulfonilamino, arilsulfonilamino, alquilaminocarbonilo, arilaminocarbonilo, alquilcarbonilamino y arilcarbonilamino
- 10 Interacción dipolo-dipolo: El término "interacción dipolo-dipolo" como se emplea en la presente memoria se refiere a la atracción que puede ocurrir entre dos o más moléculas polares. Por lo tanto, "la interacción dipolo-dipolo" se refiere a la atracción del extremo positivo sin carga, parcial de una primera molécula polar respecto del extremo negativo sin carga, parcial de la segunda molécula polar. "La interacción dipolo-dipolo" también se refiere a la unión de hidrógeno intermolecular.
- 15 Interacción electrostática: El término "interacción electrostática" como se emplea en la presente memoria se refiere a cualquier interacción que ocurre entre componentes cargados, moléculas o iones, debido a las fuerzas de atracción cuando componentes de carga eléctrica opuesta se atraen entre sí. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a: interacciones iónicas, interacciones covalentes, interacciones entre un ion y un dipolo (molécula polar e ion), interacciones entre dos dipolos (cargas parciales de moléculas polares), enlaces de hidrógeno y enlaces de dispersión de London (dipolos inducidos de moléculas polarizables). Por lo tanto, por ejemplo, "interacción iónica" o "interacción electrostática" se refiere a la atracción entre una primera molécula con carga positiva y una segunda molécula con carga negativa. Las interacciones iónicas o electrostáticas incluyen, por ejemplo, la atracción de un agente bioactivo con carga negativa.
- 25 Entidad: una entidad es unitaria. Específicamente una entidad del complejo binario del receptor de dominio Vps10p : receptor Trpv puede ser un receptor de dominio Vps10p seleccionado del grupo que consiste en Sortilina (SEC ID NO. 1), SorLA (SEC ID NO. 2), SorCS1 (SEC ID NO. 3), SorCS2 (SEC ID NO. 4) y SorCS3 (SEC ID NO. 5), y/o un receptor Trpv seleccionado del grupo que consiste en TrpVI (SEC ID NO. 6), TrpV2 (SEC ID NO. 7), TrpV3 (SEC ID NO. 8) y TrpV4 (SEC ID NO. 9).
- 30 Por consiguiente una entidad del complejo ternario del receptor de dominio Vps10p : TrkA : receptor Trpv puede ser un receptor de dominio Vps10p seleccionado del grupo que consiste en Sortilina Sortilina (SEC ID NO. 1), SorLA (SEC ID NO. 2), SorCS1 (SEC ID NO. 3), SorCS2 (SEC ID NO. 4) y SorCS3 (SEC ID NO. 5), y/o un receptor Trpv seleccionado del grupo que consiste en TrpVI (SEC ID NO. 6), TrpV2 (SEC ID NO. 7), TrpV3 (SEC ID NO. 8) y TrpV4 (SEC ID NO. 9), y/o un receptor TrkA (SEC ID NO. 10).
- 35 Fragmento Fab: El fragmento Fab de unión al antígeno del fragmento es una región en un anticuerpo que se une a antígenos. Se compone de un dominio constante y un dominio variable de cada una de las cadenas pesada y liviana. Estos dominios forman el paratopo - sitio de unión al antígeno - en el extremo terminal amino del monómero. Los dos dominios variables se unen al epitopo en sus antígenos específicos.
- 40 En un entorno experimental, los fragmentos Fc y Fab se pueden generar en el laboratorio. La enzima papaína se puede utilizar para escindir un monómero de inmunoglobulina en dos fragmentos Fab y un fragmento Fc. La enzima pepsina escinde la región bisagra inferior, por lo que se forma un fragmento F(ab')<sub>2</sub> y un fragmento Fc. Las regiones variables de las cadenas pesadas y liviana pueden estar condensados juntos para formar un fragmento variable de cadena simple (scFv), que es sólo la mitad del tamaño del fragmento Fab sin embargo, conserva la especificidad original de la inmunoglobulina progenitora.
- 45 Formar un anillo: significa que los átomos mencionados están conectados a través de un enlace cuando se forma la estructura de anillo.
- 50 Fragmentos: Los fragmentos de polipéptido de acuerdo a la presente invención, incluyendo cualquier equivalente funcional del mismo, pueden en una realización comprender menos que 500 residuos de aminoácidos, tal como menos que 450 residuos de aminoácidos, por ejemplo menos que 400 residuos de aminoácidos, tal como menos que 350 residuos de aminoácidos, por ejemplo menos que 300 residuos de aminoácidos, por ejemplo menos que 250 residuos de aminoácidos, tal como menos que 240 residuos de aminoácidos, por ejemplo menos que 225 residuos de aminoácidos, tal como menos que 200 residuos de aminoácidos, por ejemplo menos que 180 residuos de aminoácidos, tal como menos que 160 residuos de aminoácidos, por ejemplo menos que 150 residuos de aminoácidos, tal como menos que 140 residuos de aminoácidos, por ejemplo menos que 130 residuos de aminoácidos, tal como menos que 120 residuos de aminoácidos, por ejemplo menos que 110 residuos de aminoácidos, tal como menos que 100 residuos de aminoácidos, por ejemplo menos que 90 residuos de aminoácidos, tal como menos que 85 residuos de aminoácidos, por ejemplo menos que 80 residuos de aminoácidos, tal como menos que 75 residuos de aminoácidos, por ejemplo menos que 70 residuos de aminoácidos, tal como menos que 65 residuos de aminoácidos, por ejemplo menos que 60 residuos de aminoácidos, tal como menos que
- 55

55 residuos de aminoácidos, por ejemplo menos que 50 residuos de aminoácidos. Los fragmentos de neurotensina incluyen pero no se limitan a los aminoácidos del terminal C de neurotensina PYIL y YIL.

Equivalencia funcional: "equivalencia funcional" como se usa en la presente invención, de acuerdo a una realización preferente, se establece por medio de la referencia a la funcionalidad correspondiente de un fragmento predeterminado de la secuencia.

Se entenderá que los equivalentes funcionales o variantes de un modulador del receptor de dominio Vps10p exhiben las secuencias de aminoácidos que difieren gradualmente de la secuencia predeterminada preferente moduladora de la actividad de proneurotrofina, como el número y alcance de inserciones, deleciones y sustituciones incluyendo el incremento de sustituciones conservadoras. Esta diferencia se mide como una reducción en la homología entre la secuencia predeterminada preferente y el fragmento o equivalente funcional.

Una variante funcional obtenida por la sustitución, así puede exhibir alguna forma o grado de actividad moduladora de la actividad de la proneurotrofina nativa, y sin embargo, ser menos homóloga, si se sustituyen los residuos que contienen cadenas laterales de aminoácidos funcionalmente similares. Funcionalmente similar en este sentido se refiere a características dominantes de la cadenas laterales tal como hidrófobo, básico, neutro o ácido, o la presencia o ausencia de volumen estérico. Por consiguiente, en una realización de la Invención, el grado de identidad no es una medida principal de un fragmento que es una variante o equivalente funcional de un fragmento predeterminado preferido de acuerdo a la presente invención.

"Silenciamiento" génico: un proceso que conduce a la reducción de la expresión de genes endógenos. El silenciamiento génico es preferentemente el resultado de la reducción post-transcripcional de la expresión génica.

Grupo : (Resto/sustitución) como se entiende bien en esta área técnica, un gran grado de sustitución no sólo es tolerado, sino que a menudo es recomendable. La sustitución se prevé en los materiales de la presente invención. Como un medio para simplificar el debate y la recitación de cierta terminología utilizada en toda esta solicitud, los términos "grupo" y "resto" se utilizan para diferenciar especies químicas que permiten la sustitución o que pueden estar sustituidos y los que no permiten o no puede ser así sustituidos. Por lo tanto, cuando el término "grupo" se usa para describir un sustituyente químico, el material químico descrito incluye el grupo no sustituido y ese grupo con átomos de O, N, o S, por ejemplo, en la cadena, así como grupos carbonilo u otra sustitución convencional. Cuando se usa el término "resto" para describir un compuesto químico o sustituyente, sólo tiene la intención de ser incluido un material químico no sustituido. Por ejemplo, la expresión "grupo alquilo" se pretende que incluya no sólo sustituyentes alquilo de hidrocarburo saturado de cadena abierta puros, tal como metilo, etilo, propilo, t-butilo, y similares, sino también sustituyentes alquilo que llevan otros sustituyentes conocidos en la técnica, tal como hidroxilo, alcoxi, alquilsulfonilo, átomos de halógeno, ciano, nitro, amino, carboxilo, etc. Por lo tanto, "grupo alquilo" incluye grupos éter, haloalquilos, nitroalquilos, carboxialquilos, hidroxialquilos, sulfoalquilos, etc. Por otra parte, la frase "resto alquilo" se limita a la inclusión de solamente sustituyentes alquilo de hidrocarburos saturados de cadena abierta puros, tal como metilo, etilo, propilo, t-butilo, y similares. Las mismas definiciones se aplican a "grupo alqueno" y "resto alqueno"; a "grupo alquino" y "resto alquino"; a "grupo cíclico" y "resto cíclico"; a "grupo alicíclico" y "resto alicíclico"; a "grupo aromático" o "grupo arilo" y a "resto aromático" o "resto arilo", así como a "grupo heterocíclico" y "resto heterocíclico".

Grupo heterocíclico: el término "grupo heterocíclico" significa un hidrocarburo de anillo cerrado en el que uno o más de los átomos en el anillo es un elemento distinto de carbono (por ejemplo, nitrógeno, oxígeno, azufre, etc.).

Heterociclilo significa un radical cíclico monovalente saturado, que consiste en uno a dos anillos, de tres a ocho átomos por anillo, incorporando uno o dos heteroátomos anulares (elegidos entre N, O o S(O)<sub>0-2</sub>, y que puede opcionalmente ser sustituido con uno o dos sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en hidroxilo, oxo, ciano, alquilo inferior, alcoxi inferior, haloalcoxi inferior, alquiltio, halo, haloalquilo, hidroxialquilo, nitro, alcoxycarbonilo, amino, alquilamino, alquilsulfonilo, arilsulfonilo, alquilaminosulfonilo, arilaminosulfonilo, alquilsulfonilamino, arilsulfonilamino, alquilaminocarbonilo, arilaminocarbonilo, alquilcarbonilamino o arilcarbonilamino.

Heteroarilo significa un radical cíclico aromático monovalente que tiene uno a tres anillos, de cuatro a ocho átomos por anillo, incorporando uno o dos heteroátomos (elegidos entre nitrógeno, oxígeno, o azufre) dentro del anillo, que puede opcionalmente estar sustituido con uno o dos sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en hidroxilo, ciano, alquilo inferior, alcoxi inferior, haloalcoxi inferior, alquiltio, halo, haloalquilo, hidroxialquilo, nitro, alcoxycarbonilo, amino, alquilamino, alquilsulfonilo, arilsulfonilo, alquilaminosulfonilo, arilaminosulfonilo, alquilsulfonilamino, arilsulfonilamino, alquilaminocarbonilo, arilaminocarbonilo, alquilcarbonilamino y arilcarbonilamino.

Homología: La homología entre secuencias de aminoácidos puede calcularse utilizando matrices de puntuación bien conocidas tal como una cualquiera de BLOSUM 30, BLOSUM 40, BLOSUM 45, BLOSUM 50, BLOSUM 55, BLOSUM 60, BLOSUM 62, BLOSUM 65, BLOSUM 70, BLOSUM 75, BLOSUM 80, BLOSUM 85, y BLOSUM 90.

Fragmentos que comparten homología con fragmentos de SEC ID NO.: 1 a 13, respectivamente, han de considerarse como que caen dentro del alcance de la presente invención cuando son preferentemente al menos 60 por ciento homólogos, por ejemplo al menos 65 por ciento homólogos, por ejemplo al menos 70 por ciento homólogos, por ejemplo al menos 75 por ciento homólogos, por ejemplo al menos 80 por ciento homólogos, por

ejemplo al menos 85 por ciento homólogos, por ejemplo al menos 90 por ciento homólogos, por ejemplo al menos 92 por ciento homólogos, tal como al menos 94 por ciento homólogos, por ejemplo al menos 95 por ciento homólogos, tal como al menos 96 por ciento homólogos, por ejemplo al menos 97 por ciento homólogos, tal como al menos 98 por ciento homólogos, por ejemplo al menos 99 por ciento homólogos con dichas secuencias de fragmentos predeterminadas, respectivamente. De acuerdo a una realización de la invención, los porcentajes de homología se refieren a porcentajes de identidad.

Un procedimiento más adecuado para determinar las relaciones de estructura y función de los fragmentos de péptidos se describe en EE.UU. 6.013.478, que es en la presente memoria se incorpora por referencia. Además, los procedimientos de ensayo de la unión de una secuencia de aminoácidos a un resto del receptor son conocidos por el experto en la materia.

Además de las sustituciones conservadoras introducidas en cualquier posición de un modulador de actividad de la proneurotrofina predeterminada preferente, o un fragmento del mismo, también puede ser deseable introducir sustituciones no conservativas en una cualquiera o más posiciones de dicho modulador de actividad de la proneurotrofina.

Una sustitución no conservativa que conduce a la formación de un fragmento funcionalmente equivalente del modulador de la actividad de la proneurotrofina por ejemplo i) diferiría sustancialmente en la polaridad, por ejemplo un residuo con una cadena lateral no polar (Ala, Leu, Pro, Trp, Val, Ile, Leu, Phe o Met) sustituido por un residuo con una cadena lateral polar tal como Gly, Ser, Thr, Cys, Tyr, Asn, o Gln o un aminoácido cargado tal como Asp, Glu, Arg, o Lys, o sustituyendo un residuo polar o cargado por uno no polar; y/o ii) diferiría sustancialmente en su efecto sobre la orientación de la estructura polipeptídica tal como la sustitución de o por Pro o Gly mediante otro resto; y/o iii) diferiría sustancialmente en la carga eléctrica, por ejemplo la sustitución de un residuo con carga negativa tal como Glu o Asp por un residuo con carga positiva tal como Lys, His o Arg (y viceversa); y/o iv) diferiría sustancialmente en volumen estérico, por ejemplo la sustitución de un residuo voluminoso tal como His, Trp, Phe o Tyr por uno que tiene una cadena lateral menor, por ejemplo, Ala, Gly o Ser (y viceversa).

Las variantes obtenidas por sustitución de aminoácidos pueden fabricarse en una realización preferente sobre la base de los valores de hidrofiliicidad y hidrofobicidad y la similitud relativa de los sustituyentes de cadena lateral de aminoácidos, incluyendo carga, tamaño, y similares. Las sustituciones de aminoácidos ejemplares que toman varias de las características anteriores en consideración son bien conocidas por los expertos en la técnica e incluyen: arginina y lisina; glutamato y aspartato; serina y treonina; glutamina y asparagina; y valina, leucina e isoleucina.

Además de las variantes descritas en el presente documento, se pueden formular variantes estéricamente similares para imitar las partes clave de la estructura variante y que tales compuestos también se pueden utilizar de la misma manera que las variantes de la invención. Esto se puede conseguir mediante técnicas de modelado y diseño químico conocidas por los expertos en la técnica. Se entenderá que todos estas construcciones estéricamente similares caen dentro del alcance de la presente invención.

En otra realización la presente invención se refiere a variantes funcionales que comprenden aminoácidos sustituidos que tienen valores hidrofílicos o índices hidropáticos que están dentro de +/-4,9, por ejemplo dentro de +/-4,7, tal como dentro de +/-4,5, por ejemplo dentro de +/-4,3, tal como dentro de +/-4,1, por ejemplo dentro de +/-3,9, tal como dentro de +/-3,7, por ejemplo dentro de +/- 3,5, tal como dentro de +/-3,3, por ejemplo dentro de +/- 3,1, tal como dentro de +/-2,9, por ejemplo dentro de +/- 2,7, tal como dentro de +/-2,5, por ejemplo dentro de +/- 2,3, tal como dentro de +/- 2,1, por ejemplo dentro de +/- 2,0, tal como dentro de +/- 1,8, por ejemplo dentro de +/- 1,6, tal como dentro de +/- 1,5, por ejemplo dentro de +/- 1,4, tal como dentro de +/-1,3 por ejemplo dentro de +/- 1,2, tal como dentro de +/- 1,1, por ejemplo dentro de +/- 1,0, tal como dentro de +/- 0,9, por ejemplo dentro de +/- 0,8, tal como dentro de +/- 0,7, por ejemplo dentro de +/- 0,6, tal como dentro de +/- 0,5, por ejemplo dentro de +/- 0,4, tal como dentro de +/-0,3, por ejemplo dentro de +/- 0,25, tal como dentro de +/- 0,2 del valor del aminoácido que el mismo ha sustituido.

La importancia de los índices de aminoácidos hidropáticos e hidrófilos en la transmisión de la función biológica interactiva en una proteína se entiende bien en la técnica (Kyte y Doolittle, 1982 y Hopp, Patente de EE.UU. No. 4.554.101, cada uno incorporado en la presente memoria por referencia).

Los valores del índices hidropáticos de aminoácidos como se emplea en la presente memoria son: isoleucina (+4,5); valina (+4,2); leucina (+3,8); fenilalanina (+2,8); cisteína / cistina (+2,5); metionina (+1,9); alanina (+1,8); glicina (-0,4); treonina (-0,7); serina (-0,8); triptófano (-0,9); tirosina (-1,3); prolina (-1,6); histidina (-3,2); glutamato (-3,5); glutamina (-3,5); aspartato (-3,5); asparagina (-3,5); lisina (-3,9); y arginina (-4,5) (Kyte y Doolittle, 1982).

Los valores de hidrofiliicidad de aminoácidos son: arginina (+3,0); lisina (+3,0); aspartato (+3,0 + - .1); glutamato (+3,0 + - .1); serina (+0,3); asparagina (+0,2); glutamina (+0,2); glicina (0); treonina (-0,4); prolina (-0,5 + - .1); alanina (-0,5); histidina (-0,5); cisteína (-1,0); metionina (-1,3); valina (-1,5); leucina (-1,8); isoleucina (-1,8); tirosina (-2,3); fenilalanina (-2,5); triptófano (-3,4) (EE.UU. 4.554.101).

Además de los compuestos peptídicos descritos en este documento, se pueden formular compuestos estéricamente similares para imitar las partes clave de la estructura peptídica y que tales compuestos también se

pueden usar de la misma manera que los péptidos de la invención. Esto se puede conseguir mediante técnicas de modelado y diseño químico conocidas por los expertos en la técnica. Por ejemplo, la esterificación y otras alquilaciones pueden ser empleadas para modificar el extremo terminal amino de, por ejemplo, un esqueleto peptídico di-arginina, para imitar una estructura tetra peptídica. Se entenderá que todos estas construcciones estéricamente similares caen dentro del alcance de la presente invención.

Los péptidos con alquilaciones del extremo terminal N y esterificaciones del extremo terminal C también están contemplados dentro de la presente invención. Los equivalentes funcionales comprenden también conjugados agregados o covalentes y glicosilados formados con los mismos u otros fragmentos moduladores de la actividad de la proneurotrofina y/o moléculas moduladoras de la actividad de la proneurotrofina, incluyendo dímeros o restos químicos no relacionados. Tales equivalentes funcionales se preparan mediante unión de funcionalidades a grupos que se encuentran en el fragmento incluyendo en uno cualquiera o ambos de los extremos terminales N y C por procedimientos conocidos en la técnica.

Los equivalentes funcionales pueden comprender por lo tanto fragmentos conjugados con ésteres alifáticos o de acilo o amidas del extremo terminal carboxilo, alquilaminas o residuos que contengan cadenas laterales de carboxilo, por ejemplo, conjugados con alquilaminas en los residuos de ácido aspártico; O-acilo derivados de residuos que contienen grupo hidroxilo y N-acil derivados del aminoácido terminal hidroxilo o residuos que contienen grupo amino, por ejemplo, conjugados con fMet-Leu-Phe o proteínas inmunogénicas. Los derivados de los grupos acilo se seleccionan del grupo de restos alquilo (incluyendo cicloalquilo normal de C3 a C10), formando de ese modo especies alcanilo, compuestos carbocíclicos o heterocíclicos, formando de este modo especies aroilo. Los grupos reactivos preferentemente son compuestos difuncionales conocidos per se por su uso en la reticulación de proteínas para generar matrices insolubles a través de grupos laterales reactivos.

Los equivalentes funcionales covalentes o de agregación y derivados de los mismos son útiles como reactivos en inmunoensayos o para procedimientos de purificación por afinidad. Por ejemplo, un fragmento del modulador de la actividad de proneurotrofina de acuerdo a la presente invención puede ser insolubilizado por unión covalente con Sefarosa activada con bromuro de cianógeno por procedimientos conocidos per se o adsorbido a superficies de poliolefina, con o sin entrecruzamiento con glutaraldehído, para su uso en un ensayo o purificación de anticuerpos moduladores de la actividad de anti-neurotrofinas o receptores de superficie celular. Los fragmentos también pueden ser etiquetados con un grupo detectable, por ejemplo, radioyodado mediante el procedimiento de cloramina T, unido covalentemente a quelatos de tierras raras o conjugado con otro resto fluorescente para su uso en por ejemplo, ensayos de diagnóstico

La mutagénesis de un fragmento predeterminado preferido del modulador de la actividad de proneurotrofina puede llevarse a cabo haciendo inserciones de aminoácidos, usualmente en el orden de aproximadamente de 1 a 10 residuos de aminoácidos, preferentemente de aproximadamente 1 a 5 residuos de aminoácidos, o supresiones de aproximadamente de 1 a 10 residuos, tal como de alrededor de 2 a 5 residuos.

En una realización el ligando del sitio de unión 1, 2 o 3 es un oligopéptido sintetizado por síntesis automatizada. Pueden emplearse cualquiera de las técnicas de fase sólida disponibles comercialmente, tal como el procedimiento de síntesis en fase sólida de Merrifield, en el que los aminoácidos se añaden secuencialmente a una cadena de aminoácidos en crecimiento (véase Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85:2149-2146. 1963).

El equipo para la síntesis automatizada de polipéptidos está disponible comercialmente de proveedores tal como Applied Biosystems, Inc. de Foster City, CA, y generalmente pueden ser operados de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La síntesis en fase sólida permitirá la incorporación de sustituciones de aminoácidos deseables en cualquier fragmento del modulador de la actividad de proneurotrofinas de acuerdo a la presente invención. Se entenderá puede combinarse sustituciones, deleciones, inserciones o cualquier subcombinación de las mismas para llegar a una secuencia de final de un equivalente funcional. Se entenderá que las inserciones incluyen fusiones del extremo terminal carboxilo y/o extremo terminal amino, por ejemplo, con una proteína hidrófoba o inmunogénica o un vehículo tal como cualquier estructura polipeptídica o adnamiada capaz de servir como un vehículo.

Los oligómeros, incluyendo dímeros incluyendo homodímeros y heterodímeros de fragmentos de inhibidores de sortilina de acuerdo a la invención también se proporcionan y caen bajo el alcance de la invención. Los equivalentes funcionales del modulador de la actividad de proneurotrofinas y variantes se pueden producir como homodímeros o heterodímeros con otras secuencias de aminoácidos o con inhibidores de secuencias inhibidoras de sortilina nativas. Los heterodímeros incluyen dímeros que contienen fragmentos inhibidores de la sortilina inmunoreactiva así como fragmentos inhibidores de la sortilina que no necesitan tener o ejercer ninguna actividad biológica.

Los antagonistas de los receptores de dominio Vpas10p incluyendo pero sin limitarse a Sortilina que inhiben los fragmentos de péptidos se pueden sintetizar in vitro y in vivo. También se describen en la técnica anterior procedimientos para la síntesis in vitro son bien conocidos, siendo los procedimientos apropiados o convenientemente adaptables a la síntesis in vivo de inhibidores de sortilina. Cuando se sintetiza in vivo, una célula huésped se transforma con vectores que contienen ADN que codifica un inhibidor peptídico de sortilina o un fragmento del mismo. Un vector se define como una construcción de ácido nucleico replicable. Los vectores se usan para mediar la expresión del modulador de la actividad de proneurotrofinas. Un vector de expresión es una

construcción de ADN replicable en la que una secuencia de ácidos nucleicos que codifica el fragmento de inhibidor de sortilina predeterminado, o cualquier equivalente funcional del mismo que se puede expresar in vivo, está unido operativamente a secuencias de control adecuadas capaces efectuar la expresión del fragmento o equivalente en un huésped adecuado. Tales secuencias de control son bien conocidos en la técnica. Tanto las células eucariotas como las procariotas pueden usarse para la síntesis de ligandos. Los cultivos de células derivadas de organismos multicelulares sin embargo representan células huésped preferentes. En principio, cualquier cultivo de células eucariotas superiores es factible, ya sea cultivo de vertebrados o de invertebrados. Los ejemplos de útiles líneas de células huésped son células VERO y HeLa, líneas celulares de ovario de hámster chino (CHO), y WI38, BHK, COS-7, 293 y líneas celulares MDCK. Las células huésped preferentes son células eucariotas conocidas para sintetizar inhibidores de sortilina endógenos. Los cultivos de tales células huésped pueden ser aislados y utilizados como fuente del fragmento, o se utilizan en los procedimientos terapéuticos de tratamiento, incluidos los procedimientos terapéuticos destinados a promover o inhibir un estado de crecimiento, o procedimientos de diagnóstico realizados en el cuerpo humano o animal.

Enlace hidrofóbico: El término "enlace de hidrógeno" como se emplea en la presente memoria se refiere a una fuerza de atracción, o puente, que puede ocurrir entre un átomo de hidrógeno que está unido covalentemente a un átomo electronegativo, por ejemplo, oxígeno, azufre, o nitrógeno, y otro átomo electronegativo. El enlace de hidrógeno se puede producir entre un átomo de hidrógeno en una primera molécula y un átomo electronegativo en una segunda molécula (enlace de hidrógeno intermolecular). Además, el enlace de hidrógeno puede producirse entre un átomo de hidrógeno y un átomo electronegativo que están contenidos ambos en una sola molécula (enlace de hidrógeno intramolecular).

Interacción hidrofóbica: El término "interacción hidrofóbica" como se emplea en la presente memoria se refiere a cualquier interacción que ocurre esencialmente entre los componentes no polares (hidrófobos) ubicados dentro del intervalo de atracción entre sí en un entorno polar (como el agua). Como se emplea en la presente memoria, el intervalo de atracción es en la escala de 0,1 up a 2 nm. Un tipo particular de interacción hidrofóbica es ejercida por "fuerzas de Van der Waals", es decir, las fuerzas de atracción entre las moléculas no polares, que son explicadas por la mecánica cuántica. Las fuerzas de Van der Waals se asocian generalmente con momentos de dipolo momentáneos que son inducidos por moléculas vecinas y que implican cambios en la distribución de electrones.

Inhibición: El término inhibición como se emplea en la presente memoria se refiere a la prevención de la unión entre dos o más componentes de un complejo binario del receptor de dominio Vps10p: receptor TRPV, y/o un complejo ternario del receptor de dominio Vps10p /: TrkA: receptor TRPV.

In vitro/in vivo: los términos se utilizan en su significado normal.

Lesiones: son causadas por cualquier proceso que daña los tejidos. Un tumor canceroso es un ejemplo de una lesión, sin embargo, el tejido circundante dañado por un tumor es también una lesión. El trauma, incluyendo electrocución y quemaduras químicas también puede causar lesiones.

Ciertas enfermedades presentan lesiones, por ejemplo deformidades de la piel causadas por la varicela. Las lesiones también pueden ser causadas por procesos metabólicos, como una úlcera o actividad autoinmune, como en el caso de muchas formas de artritis. Las lesiones son a veces infligidas intencionalmente durante la neurocirugía, tal como la lesión cerebral cuidadosamente colocada utilizada para tratar epilepsia y otros trastornos cerebrales.

Ligando: una sustancia, compuesto o biomolécula tal como una proteína que incluye receptores, que es capaz de unirse a y formar un complejo con (una segunda) biomolécula para servir a un propósito biológico. En un sentido más estricto, es una unión de una molécula que produce señales a un sitio en una proteína diana, por fuerzas intermoleculares tal como enlaces iónicos, enlaces de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals. El acoplamiento (asociación) es generalmente reversible (disociación). La unión covalente irreversible real entre un ligando y su molécula diana es rara en los sistemas biológicos. A diferencia del significado en la química inorgánica y metalorgánica, es irrelevante si el ligando realmente se une a un sitio de metal o no, como es el caso de la hemoglobina. La unión del ligando a los receptores puede alterar la conformación química, es decir, la forma tridimensional de la proteína del receptor. El estado conformacional de una proteína del receptor determina el estado funcional de un receptor. La tendencia o la fuerza de unión se denomina afinidad. Los ligandos incluyen sustratos, inhibidores, activadores, no auto receptores, co-receptores y neurotransmisores. Los radioligandos son compuestos marcados con radioisótopos y utilizados in vivo como trazadores en estudios PET y para estudios de unión in vitro.

Los restos de un compuesto particular contemplan grupo/s o parte/s de dicho compuesto particular.

Dolor neuropático: es un dolor crónico iniciado o causado por una lesión primaria o disfunción en el sistema nervioso

Agente farmacéutico: Los términos "agente farmacéutico" o "fármaco" o "medicamento" se refieren a cualquier agente terapéutico o profiláctico que se puede usar en el tratamiento (incluyendo la prevención, diagnóstico, alivio o curación) de un trastorno, aflicción, afección, enfermedad o lesión en un paciente. Los determinantes genéticos terapéuticamente útiles, péptidos, polipéptidos y polinucleótidos pueden incluirse dentro del significado del término farmacéutico o fármaco. Como se define en la presente memoria, un "agente terapéutico", "agente farmacéutico" o "fármaco" o "medicamento" es un tipo de agente bioactivo.

Composición farmacéutica: o fármaco, medicamento o agente se refiere a cualquier material químico o biológico, compuesto, o composición capaz de inducir un efecto terapéutico deseado cuando se administra adecuadamente a un paciente. Algunos medicamentos se venden en una forma inactiva que se convierte in vivo en un metabolito con actividad farmacéutica. Para los propósitos de la presente invención, los términos "composición farmacéutica" y "medicamento" abarcan tanto el fármaco inactivo como el metabolito activo.

Polipéptido: El término "polipéptido" como se emplea en la presente memoria se refiere a una molécula que comprende al menos dos aminoácidos. Los aminoácidos pueden ser naturales o sintéticos. "Los oligopéptidos" se definen en la presente memoria como polipéptidos de longitud no superior a 100 aminoácidos. El término "polipéptido" también pretende incluir proteínas, es decir, biomoléculas funcionales que comprenden al menos un polipéptido; cuando comprenden al menos dos polipéptidos, estos pueden formar complejos, estar unidos covalentemente o pueden estar unidos no covalentemente. Los polipéptidos en una proteína pueden ser glicosilados y/o lipidados y/o pueden comprender grupos prostéticos.

Polinucleótido: "Polinucleótido" como se emplea en la presente memoria se refiere a una molécula que comprende al menos dos ácidos nucleicos. Los ácidos nucleicos pueden ser de origen natural o modificados, tal como ácidos nucleicos bloqueados (LNA) o ácidos nucleicos peptídicos (PNA). El polinucleótido como se emplea en la presente memoria en general se aplica a

- i) un polinucleótido que comprende una secuencia de codificación predeterminada, o
- ii) un polinucleótido que codifica una secuencia de aminoácidos predeterminada, o
- iii) un polinucleótido que codifica un fragmento de un polipéptido codificado por polinucleótidos (i) o (ii), en el que dicho fragmento tiene al menos una actividad predeterminada como se especifica en la presente memoria; y

iv) un polinucleótido cuya hebra complementaria se hibridiza en condiciones rigurosas con un polinucleótido como se define en uno cualquiera de los puntos (i), (ii) y (iii), y codifica un polipéptido, o un fragmento del mismo, que tiene al menos una actividad predeterminada como se especifica en la presente memoria; y

v) un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que se degenera convirtiéndose en la secuencia de nucleótidos de los polinucleótidos (iii) o (iv);

o la hebra complementaria de dicho polinucleótido.

Anticuerpo purificado: El término un "anticuerpo purificado" es un anticuerpo donde al menos 60 por ciento en peso del mismo está libre de los polipéptidos y moléculas orgánicas de origen natural con las que naturalmente se asocia. Preferentemente, la preparación de anticuerpo comprende anticuerpo en una cantidad de al menos 75 por ciento en peso, más preferentemente al menos 90 por ciento en peso, y mucho más preferentemente al menos 99 por ciento en peso.

Desviación cuadrada media: El término "desviación cuadrada media" (rmsd) se utiliza como un medio de comparar dos estructuras estrechamente relacionadas y se refiere a la desviación en la distancia entre átomos relacionados de las dos estructuras después de minimizar estructuralmente esta distancia en una alineación. Las proteínas afines con estructuras estrechamente relacionadas se caracterizan por valores relativamente bajos de RMSD mientras que las diferencias más grandes resultarán en un aumento del valor de RMSD.

Identidad de secuencia: la identidad de secuencia se determina en una realización utilizando fragmentos de péptidos moduladores de la actividad de la proneurotrofina que comprenden al menos 25 aminoácidos contiguos y que tienen una secuencia de aminoácidos que es al menos 80%, tal como 85%, por ejemplo 90%, tal como 95%, por ejemplo 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEC ID NO.: 1, SEC ID NO.: 2, SEC ID NO.: 3, SEC ID NO.: 4, SEC ID NO.: 5, SEC ID NO.: 6, SEC ID NO.: 7, SEC ID NO.: 8, SEC ID NO.: 9 y SEC ID NO.: 10 respectivamente, en el que la identidad porcentual se determina con el algoritmo GAP, BESTFIT, o FASTA en Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0, utilizando pesos de espacios por defecto.

Los siguientes términos se utilizan para describir las relaciones de secuencias entre dos o más polinucleótidos: "secuencia predeterminada", "ventana de comparación", "identidad de secuencia", "porcentaje de identidad de secuencia", y "identidad sustancial".

Una "Secuencia predeterminada" es una secuencia definida utilizada como base para una comparación de secuencias; una secuencia predeterminada puede ser un subconjunto de una secuencia más grande, por ejemplo, como un segmento de un ADN de longitud completa o secuencia génica dada en un listado de secuencias, tal como una secuencia de polinucleótidos de SEC ID NO. : 1, o puede comprender una secuencia de ADN completo o génica. Generalmente, una secuencia predeterminada tiene al menos 20 nucleótidos de longitud, con frecuencia al menos 25 nucleótidos de longitud, y con frecuencia al menos 50 nucleótidos de longitud.

Debido a que dos polinucleótidos pueden cada uno (1) comprender una secuencia (es decir, una porción de la secuencia de polinucleótidos completa) que es similar entre los dos polinucleótidos, y (2) comprender además una

secuencia que es divergente entre los dos polinucleótidos, las comparaciones de secuencias entre dos (o más) polinucleótidos se realiza típicamente comparando las secuencias de los dos polinucleótidos sobre una "ventana de comparación" para identificar y comparar regiones locales de similitud de secuencia. Una "ventana de comparación", como se emplea en la presente memoria, se refiere a un segmento conceptual de al menos 20 posiciones de nucleótidos contiguos en el que una secuencia de polinucleótidos puede compararse con una secuencia predeterminada de al menos 20 nucleótidos contiguos y en el que la parte de la secuencia de polinucleótidos en la ventana de comparación puede comprender adiciones o deleciones (es decir, espacios) de 20 por ciento o menos en comparación con la secuencia predeterminada (que no comprende adiciones o deleciones) para el alineamiento óptimo de las dos secuencias.

El alineamiento óptimo de secuencias para alinear una ventana de comparación puede ser conducido mediante el algoritmo de homología local de Smith y Waterman (1981) Adv. Appl. Math. 2: 482, mediante el algoritmo de alineamiento de homología de Needleman y Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48: 443, mediante el procedimiento de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 85: 2444, mediante implementaciones computerizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, y TFASTA en Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.), o mediante inspección, y se selecciona el mejor alineamiento (es decir, que resulta en el mas alto porcentaje de homología respecto de la ventana de comparación) generado por los diversos procedimientos.

El término "identidad de secuencia" significa que dos secuencias polinucleótidos son idénticas (es decir, en forma nucleótido - por - nucleótido) sobre la ventana de comparación. El término "porcentaje de Identidad de secuencia" se calcula comparando dos secuencias óptimamente alineadas sobre la ventana de comparación, determinando el número de posiciones en las que la base de ácido nucleico idéntica (por ejemplo, A, T, C, G, U o I) se produce en ambas secuencias para dar el número de posiciones coincidentes, dividiendo el número de posiciones coincidentes por el número total de posiciones en la ventana de comparación (es decir, el tamaño de ventana), y multiplicando el resultado por 100 para obtener el porcentaje de identidad de secuencia. Los términos "identidad sustancial" c como se emplea en la presente memoria indica una característica de una secuencia de polinucleótidos, en la que el polinucleótido comprende una secuencia que tiene al menos 85 por ciento de identidad de secuencia, preferentemente al menos 90 a 95 por ciento de identidad de secuencia, más habitualmente de al menos 99 por ciento de identidad de secuencia en comparación con una secuencia predeterminada en una ventana de comparación de al menos 20 posiciones de nucleótidos, con frecuencia sobre una ventana de al menos 25-50 nucleótidos, en el que el porcentaje de identidad de secuencia se calcula comparando la secuencia predeterminada con la secuencia de polinucleótidos que puede incluir deleciones o adiciones que suman el 20 por ciento o menos de la secuencia predeterminada sobre la ventana de comparación. La secuencia predeterminada puede ser un subconjunto de una secuencia más grande, por ejemplo, como un segmento de la secuencia de polinucleótidos SEC ID NO : 1 de longitud completa ilustrada en el presente documento.

Como se aplica a polipéptidos, un grado de identidad de secuencias de aminoácidos es una función del número de aminoácidos idénticos en las posiciones compartidas por las secuencias de aminoácidos. Un grado de homología o similitud de las secuencias de aminoácidos es una función del número de aminoácidos, es decir, estructuralmente relacionados, en las posiciones compartidas por las secuencias de aminoácidos.

Una secuencia "no afín" o "no homóloga" que comparte menos del 40% de identidad, aunque preferentemente menos que el 25% de identidad, con una de las secuencias de polipéptidos moduladores de la actividad de proneurotrofinas de la presente invención. El término "identidad sustancial" significa que dos secuencias peptídicas, cuando se alinean óptimamente, tal como por los programas GAP o BESTFIT utilizando pesos de espacios por defecto, comparten al menos 80 por ciento de identidad de secuencia, preferentemente al menos 90 por ciento identidad de secuencia, más preferentemente al menos del 95 por ciento de identidad de secuencia o más (por ejemplo, el 99 por ciento de identidad de secuencia). Preferentemente, las posiciones de residuos que no son idénticas difieren por sustituciones conservadoras de aminoácidos.

Las sustituciones de aminoácidos conservadores se refieren a la intercambiabilidad de residuos que tienen similares cadenas laterales. Por ejemplo, un grupo de aminoácidos que tiene cadenas laterales alifáticas es glicina, alanina, valina, leucina y isoleucina; un grupo de aminoácidos que tiene cadenas laterales de hidroxilo alifático es serina y treonina, un grupo de aminoácidos que tiene cadenas laterales que contienen amida es asparagina y glutamina; un grupo de aminoácidos que tiene cadenas laterales aromáticas es fenilalanina, tirosina, triptófano y; un grupo de aminoácidos que tiene cadenas laterales básicas es lisina, arginina, y histidina; y un grupo de aminoácidos que tiene cadenas laterales que contienen azufre es cisteína y metionina. Los grupos de sustitución de aminoácidos conservadores preferidos son: valina-leucina isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina, y asparaginaglutamina.

Además, las variantes también se determinan basándose en un número predeterminado de sustituciones de aminoácidos conservadores como se define en la presente memoria a continuación. La sustitución de aminoácidos conservadores s como se emplea en la presente memoria se refiere a la sustitución de un aminoácido (dentro de un grupo predeterminado de aminoácidos) por otro aminoácido (dentro de un mismo grupo), en el que los aminoácidos exhiben características similares o sustancialmente similares.

Dentro del significado del término "sustitución de aminoácidos conservadores" como se aplica en la presente memoria, un aminoácido puede ser sustituido por otro dentro de grupos de aminoácidos indicados en la presente memoria a continuación:

- i) Aminoácidos que tienen cadenas laterales polares (Asp, Glu, Lys, Arg, His, Asn, Gln, Ser, Thr, Tyr, y Cys,)
- 5 ii) Aminoácidos que tienen cadenas laterales no polares (Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Phe, Trp, Pro, y Met)
- iii) Aminoácidos que tienen cadenas laterales alifáticas (Gly, Ala Val, Leu, Ile)
- iv) Aminoácidos que tienen cadenas laterales cíclicas (Phe, Tyr, Trp, His, Pro)
- v) Aminoácidos que tienen cadenas laterales aromáticas (Phe, Tyr, Trp)
- vi) Aminoácidos que tienen cadenas laterales ácidas (Asp, Glu)
- 10 vii) Aminoácidos que tienen cadenas laterales básicas (Lys, Arg, His)
- viii) Aminoácidos que tienen cadenas laterales amida (Asn, Gln)
- ix) Aminoácidos que tienen cadenas laterales hidroxí (Ser, Thr)
- x) Aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen azufre (Cys, Met),
- xi) Aminoácidos débilmente hidrofóbicos neutrales(Pro, Ala, Gly, Ser, Thr)
- 15 xii) Aminoácidos ácidos hidrofílicos (Gln, Asn, Glu, Asp), y
- xiii) Aminoácidos hidrofóbicos (Leu, Ile, Val)

Por consiguiente, una variante o un fragmento del mismo de acuerdo a la invención puede comprender, dentro de la misma variante de la secuencia o fragmentos de la misma, o entre diferentes variantes de la secuencia o fragmentos de la misma, al menos una sustitución, tal como una pluralidad de sustituciones introducidas independientemente entre sí.

Se desprende de la descripción anterior que la misma variante o fragmento del mismo pueden comprender más de una sustitución de aminoácido conservador de más de un grupo de aminoácidos conservadores como se define en la presente memoria más arriba.

La adición o deleción de al menos un aminoácido puede ser una adición o eliminación de preferentemente 2 a 250 aminoácidos, tal como de 10 a 20 aminoácidos, por ejemplo de 20 a 30 aminoácidos, tal como de 40 a 50 aminoácidos. Sin embargo, las adiciones o deleciones de más de 50 aminoácidos, tal como adiciones de 50 a 100 aminoácidos, adición de 100 a 150 aminoácidos, adición de 150-250 aminoácidos, también están comprendidas dentro de la presente invención. La deleción y/o la adición independientemente una de otra pueden ser una deleción y/o una adición dentro de una secuencia y/o al final de una secuencia.

30 ARNsi: "ARN interferente pequeño" (ARNsi) es una molécula de ARN de doble hebra corta (a menudo, pero sin limitarse a, menos que 30 nucleótidos de largo) capaz de provocar el silenciamiento gen específico en células de mamíferos.

Alquilo inferior sustituido significa un alquilo inferior que tiene uno a tres sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en hidroxilo, alcoxi, amino, amido, carboxilo, acilo, halógeno, ciano, nitro y tiol.

35 Tratamiento: El término "tratamiento" como se emplea en la presente memoria se refiere un procedimiento que implica terapia incluyendo cirugía de una afección clínica en un individuo, incluyendo un cuerpo humano o animal. La terapia puede ser mejoradora, curativa o profiláctica, es decir, redactora de los síntomas de dolor.

Variantes: El término "variantes" como se emplea en la presente memoria se refiere a variantes de secuencias de aminoácidos teniendo preferentemente dichas variantes al menos 60% de identidad, por ejemplo al menos 63% de identidad, tal como al menos 66% de identidad, por ejemplo al menos 70% de identidad de secuencia, por ejemplo al menos 72% de identidad de secuencia, por ejemplo al menos 75% de identidad de secuencia, por ejemplo al menos 80% de identidad de secuencia, tal como al menos 85% de identidad de secuencia, por ejemplo al menos 90% de identidad de secuencia, tal como al menos 91 % de identidad de secuencia, por ejemplo al menos 91% de identidad de secuencia, tal como al menos 92% de identidad de secuencia, por ejemplo al menos 93% de identidad de secuencia, tal como al menos 94% de identidad de secuencia, por ejemplo al menos 95% de identidad de secuencia, tal como al menos 96% de identidad de secuencia, por ejemplo al menos 97% de identidad de secuencia, tal como al menos 98% de identidad de secuencia, por ejemplo 99% de identidad de secuencia con cualquiera de las secuencias predeterminadas.

Regulación al alza de la expresión: un proceso que conduce a una mayor expresión de los genes, preferentemente

de genes endógenos.

Dolor

5 Los presentes inventores han descubierto que las sensaciones de dolor pueden ser eliminadas mediante la prevención de la interacción entre un receptor de dominio Vps10p en combinación con el receptor Trpv y un tercer componente que incluye pero no se limita a un receptor TrkA. El dolor puede ser subdividido en dolor crónico y dolor agudo que a su vez puede ser aún más sub-dividido.

Por consiguiente, en una realización el dolor es dolor crónico.

En otra realización el dolor es dolor neuropático.

En otra realización el dolor crónico es dolor neuropático.

10 En otra realización el dolor agudo es dolor neuropático.

En otra realización el dolor neuropático se selecciona del grupo que consiste en dolor neuropático periférico, dolor neuropático central y dolor neuropático mixto.

En otra realización el dolor neuropático se debe a lesión mecánica de los nervios periféricos o centrales, lesión metabólica, lesión infecciosa o invasión del cáncer de nervios por tumor y tratamiento citotóxico.

15 En otra realización la lesión mecánica se debe a lesiones accidentales, compresión o axotomía incluyendo amputación y operación.

En una realización la lesión metabólica que provoca el dolor es neuropatía diabética.

En otra realización la lesión infecciosa que provoca el dolor es herpes zoster y neuropatía por HIV.

En otra realización el dolor como se describe en la presente memoria más arriba es dolor agudo.

20 Complejo de receptores diana

El agente (analgésico) como se define en la presente memoria está dirigido a prevenir la formación de un complejo diana especificado, dicho complejo diana en la formación y es capaz de inducir una sensación de dolor.

En una realización el receptor de dominio Vps10p de dicho complejo es al menos 60% idéntico a SEC ID NO. 1.

25 En otra realización dicho receptor de dominio Vps10p se selecciona del grupo que consiste en SEC ID NO. 1, SEC ID NO. 2, SEC ID NO. 3, SEC ID NO. 4 y SEC ID NO. 5.

En una realización de la presente invención el receptor Trpv del complejo se selecciona del grupo que consiste en SEC ID NO. 6, SEC ID NO. 7, SEC ID NO. 8 y SEC ID NO. 9.

En otra realización de la presente invención el receptor TrkA es SEC ID NO. 10.

En una realización el mamífero al que se administran los agentes de la presente invención, es un ser humano.

30 **Agente analgésico**

35 Se divulga el uso de al menos un agente (antagonista, compuesto, inhibidor o su sinónimo) capaz de unirse a un receptor (una entidad) del complejo binario del receptor de dominio Vps10p : receptor Trpv, y/o complejo ternario del receptor de dominio Vps10p : TrkA : receptor Trpv inhibiendo de ese modo la actividad transductora de dolor de dicho complejo, en la fabricación de un medicamento, para el tratamiento y/o prevención de dolor, incluyendo pero sin limitarse a dolor agudo, dolor neuropático y dolor crónico, en un animal.

También se divulga el uso de al menos un agente capaz de unirse a una entidad del:

a. complejo binario del receptor de dominio Vps10p : receptor Trpv, y/o

40 b. complejo ternario del receptor de dominio Vps10p : TrkA : receptor Trpv complejo ternario inhibiendo de ese modo la formación de dicho complejo, para la preparación de un medicamento para el tratamiento de dolor en un mamífero.

También se describe el uso de al menos un agente capaz de inhibir la formación del:

a. complejo binario del receptor de dominio Vps10p : receptor Trpv, y/o

b. complejo ternario del receptor de dominio Vps10p : TrkA : receptor Trpv, para la preparación de un medicamento para el tratamiento de dolor en un mamífero.

También se describe al menos un agente capaz de inhibir la formación del:

- a. complejo binario del receptor de dominio Vps10p : receptor Trpv, y/o
- b. complejo ternario del receptor de dominio Vps10p : TrkA : receptor Trpv, para su uso en un procedimiento para el tratamiento de dolor en un mamífero.

5 En una realización al menos un agente como se debate en la presente memoria más arriba es seleccionado de proteínas, péptidos, polipéptidos, anticuerpos, ARN antisentido, ADN antisentido, moléculas orgánicas pequeñas, ARNsi, receptor soluble de dominio Vps10ps y fragmentos y variantes del mismo, soluble receptor Trpvs y fragmentos y variantes del mismo y receptores soluble TrkAs y fragmentos y variantes del mismo.

En una realización el mamífero al que se le administran los agentes, es un ser humano, un ratón o una rata.

10 En una realización el mamífero al que se le administran los agentes, es un conejo.

*Epítipo de unión*

15 La presente invención se refiere a agentes capaces de inhibir el complejo diana como se define en la presente memoria más arriba. La invención realiza ello uniéndose a una entidad de dicho complejo. Por consiguiente, en una realización al menos un agente se une a al menos un residuo de aminoácido del sitio de unión que comprende los residuos de aminoácidos R325, S316, Y351, I353, K260, I327, F314, F350 a M363, S305, F306, T398 a G400, I303-G309, Q349-A356, Y395 y T402 de SEC ID NO. 1 o un fragmento o variante del mismo.

En otra realización al menos un agente se une a al menos un residuo de aminoácido del sitio de unión que comprende los residuos de aminoácidos R325, S316, Y351, I353, K260, I327, F314, F350 a M363, S305, F306 y T398 a G400 de SEC ID NO. 1 o un fragmento o variante del mismo.

20 En otra realización al menos un agente se une a al menos un residuo de aminoácido del sitio de unión que comprende los residuos de aminoácidos R325, S316, Y351, I353, K260, I327, F314 y F350 a M363 de SEC ID NO. 1 o un fragmento o variante del mismo.

25 En otra realización al menos un agente se une a al menos un residuo de aminoácido del sitio de unión que comprende los residuos de aminoácidos L572, L114, V112, R109 a S111, S115 a G118, T570, G571, W586, W597, T168-1174, L572, A573 y S584 a F588 de SEC ID NO. 1 o un fragmento o variante del mismo.

En otra realización al menos un agente se une a al menos un residuo de aminoácido del sitio de unión que comprende los residuos de aminoácidos L572, L114, V112, R109 a S111, S115 a G118, T570, G571, W586 y W597 de SEC ID NO. 1 o un fragmento o variante del mismo.

30 En otra realización al menos un agente se une a al menos un residuo de aminoácido del sitio de unión que comprende los residuos de aminoácidos L572, L114 y V112 de SEC ID NO. 1 o un fragmento o variante del mismo.

En otra realización al menos un agente se une a al menos un residuo de aminoácido del sitio de unión que comprende los residuos de aminoácidos D403, S420, D422, N423, S424, I425, E426, E444, T451, Y466, E470, I498, S499 y V500 de SEC ID NO. 1 o un fragmento o variante del mismo.

35 En otra realización al menos un agente se une a al menos un residuo de aminoácido del sitio de unión que comprende los residuos de aminoácidos D403, N423, S424, I425, E444, T451, Y466, I498 y V500 de SEC ID NO. 1 o un fragmento o variante del mismo.

En otra realización al menos un agente se une a al menos un residuo de aminoácido del sitio de unión que comprende los residuos de aminoácidos E444, T451, Y466, I498 y V500 de SEC ID NO. 1 o un fragmento o variante del mismo.

40 *Definición estructural del agente*

Los agentes capaces de unirse a los epítipos definidos más arriba, se seleccionan del grupo que consiste en proteínas, péptidos, oligopéptidos, polipéptidos, anticuerpos, ARN antisentido, ADN antisentido, moléculas orgánicas pequeñas, ARNsi y receptores solubles seleccionados del grupo que consiste en receptor Trpvs, receptor TrkAs y receptor de dominio Vps10ps y fragmentos y variantes de los mismos, o una combinación de los mismos.

45 En una realización, el agente se selecciona del grupo que consiste en:

- a. un polipéptido aislado seleccionado del grupo que consiste en
  - i. una secuencia de aminoácidos que consiste en SEC ID NOs.: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10;
  - ii. una variante de secuencia biológicamente activa de la secuencia de aminoácidos de a) en la que la variante tiene al menos 70% de identidad de secuencia respecto de dicha SEC ID NO.: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8,9o10;o

- iii. un fragmento biológicamente activo de cualquiera de i o ii en el que dicho fragmento comprende al menos 50 aminoácidos contiguos de cualquiera de a) a b), y que tiene al menos 70% de identidad de secuencia respecto de SEC ID NO.: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 en un intervalo de superposición de al menos 50 aminoácidos, en el que la actividad biológica es inhibir la formación del: complejo binario del receptor de dominio Vps10p : receptor Trpv, y/o el complejo ternario del receptor de dominio Vps10p : TrkA : receptor Trpv; o
- 5 b. un nucleótido aislado que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido como se define según a) o una secuencia de ácidos nucleicos que es una secuencia complementaria de una secuencia que codifica un polipéptido como se define según a), o
- c. un vector de expresión que comprende la secuencia de ácidos nucleicos como se define según b), o
- 10 d. una composición de células, en la que dichas células son transformadas o transducidas con el vector como se define según c), o
- e. una línea celular de empaquetado que comprende la secuencia de ácidos nucleicos como se define según b).
- En otra realización, el polipéptido es una variante alélica de origen natural de la secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEC ID NO.: SEC ID NO.: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10.
- 15 En aún otra realización, el polipéptido es una variante de polipéptido que se describe en el mismo, en el que cualquier aminoácido especificado en la secuencia especificada es alterado para proporcionar una sustitución conservadora.
- En una realización, el polipéptido tiene al menos 70% de identidad de secuencia, tal como 75% de identidad de secuencia, tal como 80% de identidad de secuencia, tal como 85% de identidad de secuencia, tal como 90% de identidad de secuencia, tal como 95% de identidad de secuencia, tal como 96% de identidad de secuencia, tal como 97% de identidad de secuencia, tal como 98% de identidad de secuencia, tal como 99% de identidad de secuencia, tal como 100% de identidad de secuencia respecto de una proteína que tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEC ID NO.: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10.
- 20 En una realización, el polipéptido es glicosilado.
- 25 En aún otra realización, polipéptido es un polipéptido soluble que es un fragmento de cualquiera de dicha SEC ID NO.: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10.
- En aún otra realización, el polipéptido es capaz de formar al menos un puente de cistina intramolecular.
- En aún otra realización, el polipéptido comprende un dímero de dicho polipéptido unido a al menos un puente de cistina intermolecular.
- 30 En aún otra realización, el polipéptido además comprende una cola de afinidad, tal como una cola polyhis, una cola GST, una cola HA, una cola Flag, una cola C-myc, una cola HSV, una cola V5, una cola de proteína de unión a maltosa, una cola del dominio de unión a celulosa.
- En una realización, el agente es un nucleótido que codifica un polipéptido que tiene al menos 70% de identidad de secuencia respecto de una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEC ID NO.: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10.
- 35 En otra realización, el nucleótido codifica un polipéptido que tiene al menos 70% de identidad de secuencia, tal como 75% de identidad de secuencia, tal como 80% de identidad de secuencia, tal como 85% de identidad de secuencia, tal como 90% de identidad de secuencia, tal como 95% de identidad de secuencia, tal como 96% de identidad de secuencia, tal como 97% de identidad de secuencia, tal como 98% de identidad de secuencia, tal como 99% de identidad de secuencia, tal como 100% de identidad de secuencia identidad de secuencia respecto de una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEC ID NO.: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10.
- 40 En aún otra realización el agentes es un vector que comprende la molécula de ácido nucleico como se define en la presente memoria más arriba.
- En otra realización, el vector se selecciona del grupo que consiste en vectores obtenidos de la familia Retroviridae incluyendo lentivirus, HIV, SIV, FIV, EAIV, CIV.
- 45 En otra realización, el vector se selecciona del grupo que consiste en alfavirus, adenovirus, virus adeno asociado, baculovirus, HSV, coronavirus, virus del papiloma bovino, Mo-MLV, preferentemente virus adeno asociado.
- En otra realización, el vector comprende un promotor operativamente ligado a la molécula de ácido nucleico.
- En una realización, dicho promotor se selecciona del grupo que consiste en: CMV, UbiC humano, RSV, promotor Tet regulable, Mo-MLV-LTR, MxI, EF-lalpha, PDGF beta y CaMK II.
- 50

5 En una realización, el agente es una célula transformada o transducida con uno o más vectores como se define en la presente memoria más arriba. Dicha célula puede ser implantada en un sujeto con el fin de producir agentes polipeptídicos de acuerdo a la invención. Las células pueden, además, ser encapsuladas en una cápsula biocompatible y administradas al sujeto que lo necesita. De esta manera, el agente según se puede administrar localmente en el sistema nervioso central, evitando así las dificultades en el paso de la barrera hematoencefálica.

En una realización, la células capaz de producir el agente se selecciona del grupo que consiste en *Saccharomyces cerevisiae*, *E. coli*, *Aspergillus* y células de insectos Sf9.

10 En otra realización, la células capaz de producir el agente se selecciona del grupo que consiste en células de mamífero seleccionadas del grupo que consiste en células de ser humano, felino, porcino, simio, canino, rata y murinas.

En otra realización, la células de mamífero capaz de producir el agente se selecciona del grupo que consiste en neuronas y células gliales.

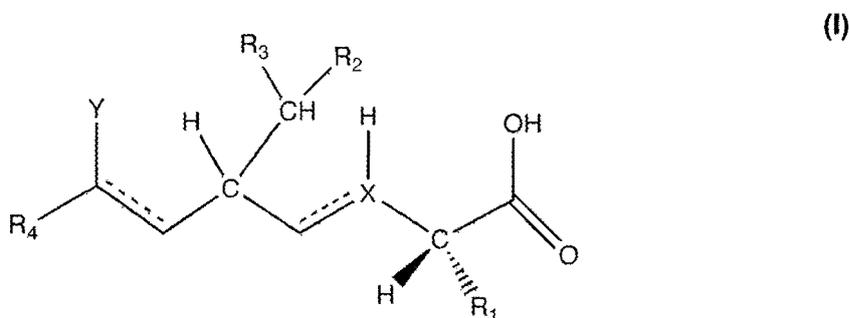
El uso de la reivindicación 34 en la que dicha célula se selecciona del grupo que consiste en células CHO, CHO-K1, HEI193T, HEK293, COS, PC12, HiB5, RN33b y BHK

15 En aún otra realización, la invención se refiere a una línea celular de empaquetado capaz de producir una partícula viral infecciosa, donde dicha partícula viral comprende un genoma derivado de Retroviridae que comprende un retroviral LTR 5', un sitio de unión ARNt, una señal de empaquetamiento, un promotor operativamente unido a una secuencia de polinucleótidos que codifica el agente polipeptídico como se define en la presente memoria más arriba, un origen de síntesis de la segunda cadena de ADN, y un retroviral LTR 3'

20 En otra realización, en la que el genoma de la partícula viral se obtiene lentiviralmente y los LTRs son lentiviral.

En una realización, el agente es capaz de unirse a la entidad receptor de dominio Vps10p. En una realización preferente, el agente es un agente de unión a Sortilina, inhibiendo la formación de un complejo de Sortilina:TrpV:TrkA.

En dicha realización, el agente tiene la estructura general de fórmula (I):



25 en el que X es un átomo que actúa como dador de hidrógeno dicho átomo seleccionado del grupo que consiste en N, O, S, P y en el que

Y es un átomo electronegativo que actúa como aceptor de enlace de hidrógeno seleccionado del grupo que consiste en O, N, S, F, Cl, Br, I, y en el que

30 R<sub>1</sub> es Alquilo C3-6, cíclico C4-6, un heterocíclico o una estructura heteroaromática que tiene un anillo, de 4 a 6 miembros anulares en cada uno y de 1 a 3 heteroátomos, o una heteroalquilo que comprende 1 a 3 heteroátomos seleccionados del grupo que consiste en N, O, S(O)<sub>0-2</sub>, y en el que

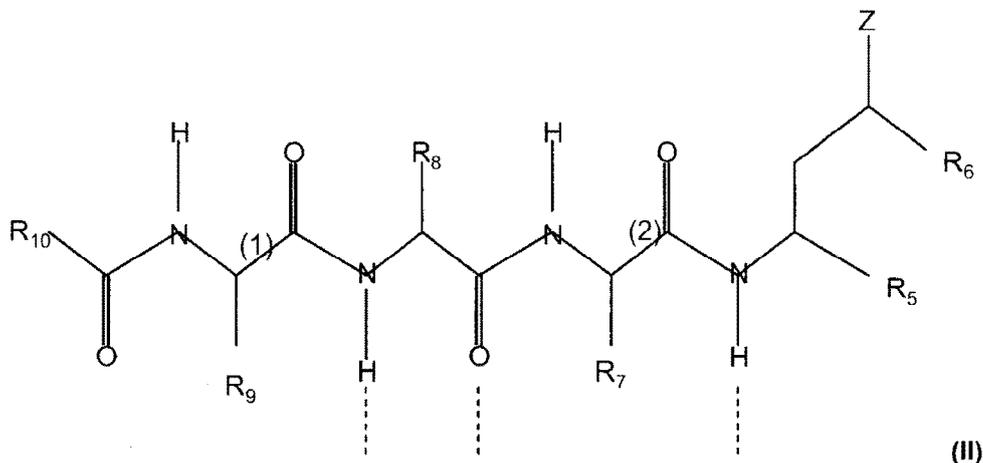
35 R<sub>2</sub> es un hidrógeno, un alquilo C1-12 o un aromático, un carbocíclico, una estructura heterocíclica o heteroaromática que tiene 1-3 anillos, 3-8 miembros anulares en cada uno y 0 a 4 heteroátomos, o un heteroalquilo que comprende 1 a 8 heteroátomos seleccionados del grupo que consiste en N, O, S(O)<sub>0-2</sub>, y en el que

R<sub>3</sub> es hidrógeno, SH, imidazol, alquilo C1-12 o un aromático, un carbocíclico, un heterocíclico o una estructura heteroaromática que tiene 1-3 anillos, 3-8 miembros anulares en cada uno y 0 a 4 heteroátomos, o un heteroalquilo que comprende 1 a 8 heteroátomos seleccionados del grupo que consiste en N, O, S, y en el que

40 R<sub>4</sub> es seleccionado de los grupos funcionales alquilo lineal o ramificado C1-100, alqueno lineal o ramificado, alquino lineal o ramificado, fenilo, bencilo, haloalcano, cloroalcano, bromoalcano, yodoalcano, haloformilo, hidroxilo, carbonilo, aldehído, éster carbonato, carboxilato, carboxilo, éter, éster, hidroperoxi, peroxi, carboxamida, amina primaria, amina secundaria, amina terciaria, amonio, cetimina primaria, cetimina secundaria, aldimina primaria,

aldimina secundaria, imida, azida, azo (diimida), cianato, isocianuro, isotiocianato, nitrato, nitrilo, nitrosooxi, nitro, nitroso, priidilo, fosfino, fosfato, fosfono, sulfonilo, sulfinilo, sulfhidrilo (SH), tiocianato, disulfuro, un acoplador L2 o L3, y una secuencia de aminoácidos que es al menos 50% idéntica a SEC ID NO.: 10 o un fragmento de la misma.

En otra realización, el agente tiene la estructura general de fórmula (II):



5

en el que Z es un dador de enlace de hidrógeno o aceptor seleccionado del grupo que consiste en carbonilo, hidroxilo, amino, imino, amida, sulfhidrilo, cloro, fluoro, y en el que

R<sub>5</sub> se selecciona del grupo que consiste en H, CH<sub>3</sub>, y un acoplador L2, y en el que

R<sub>6</sub> se selecciona del grupo que consiste en H, -CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> y -OCH<sub>3</sub>, y en el que

10 R<sub>7</sub> se selecciona del grupo que consiste en cadenas laterales de glutamato, glutamina, lisina, arginina, histidina, tirosina, metionina, cisteína, grupos alifáticos C4-6, y en el que

R<sub>8</sub> se selecciona del grupo que consiste en cadenas laterales de tirosina, histidina, serina, treonina, aspartato, asparagina, cisteína, fenilalanina, yodo-tirosina y -CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>, y en el que

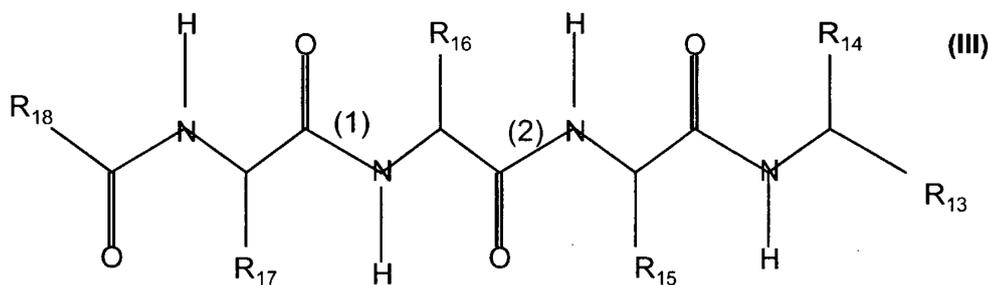
15 R<sub>9</sub> se selecciona del grupo que consiste en cadena lateral de lisina, arginina, glutamina, grupos heteroalifáticos y alifáticos C3-8, grupos heterocíclicos y carbocíclicos que comprende anillos de 5 o 6 miembros, y en el que

R<sub>10</sub> se selecciona del grupo que consiste en un piroglutamato, poli-carbohidratos y un polipéptido de longitud mayor que igual a 10, y en el que

20 R<sub>11</sub> y R<sub>12</sub> individualmente se seleccionan del grupo que consiste en H, alquilo lineal o ramificado C1-12, alqueno lineal o ramificado, alquinilo lineal o ramificado, fenilo, bencilo, haloalcano, cloroalcano, bromoalcano, yodoalcano, haloformilo, hidroxilo, carbonilo, aldehído, éster carbonato, carboxilato, carboxilo, éter, éster, hidroperoxi, peroxi, carboxamida, amina primaria, amina secundaria, amina terciaria, amonio, cetimina primaria, cetimina secundaria, aldimina primaria, aldimina secundaria, imida, azida, azo (diimida), cianato, isocianuro, isotiocianato, nitrato, nitrito, nitrosooxi, nitro, nitroso, priidilo, fosfino, fosfato, fosfono, sulfonilo, sulfinilo, sulfhidrilo (SH), y en el que

25 Los enlaces covalentes (1) y (2) individualmente se seleccionan del grupo que consiste en enlaces simples y enlaces dobles.

En otra realización el agente tiene la estructura general de fórmula (III):



en el que R<sub>13</sub> se selecciona del grupo que consiste en H, alquilo C1-12, alquenilo, alquinilo y un acoplador L3, y en el que

5 R<sub>14</sub>, R<sub>15</sub>, R<sub>17</sub>, R<sub>19</sub>, R<sub>20</sub> individualmente se seleccionan del grupo que consiste en H, alquilo C1-12, alquenilo y alquinilo, y en el que

R<sub>16</sub> se selecciona del grupo que consiste en cadenas laterales de fenilalanina, leucina, isoleucina, valina, metionina, histidina, cisteína, lisina y alifático C3-7, y en el que

R<sub>18</sub> se selecciona del grupo que consiste en H, -CH<sub>3</sub> y -CH<sub>2</sub>OH, y en el que

10 los enlaces covalentes (1) y (2) individualmente se seleccionan del grupo que consiste en enlaces simples y enlaces dobles.

En una realización, el acoplador L2 mencionado en la presente memoria más arriba se selecciona del grupo que consiste en un esqueleto peptídico de 5 a 6 residuos, alquilo C15-20, alquenilo C15-20 y alquinilo C15-20.

En otra realización dicho acoplador L2 acopla la fórmula general (I) a la fórmula general (II), formando de ese modo un agente que tiene la fórmula general (IV):

15 [Fórmula (I)] - [Acoplador L2] - [Fórmula (II)] (IV)

En una realización, el acoplador L3 se selecciona del grupo que consiste en un esqueleto peptídico de 12 a 20 residuos, alquilo C30-60, alquenilo C30-60, alquinilo C30-60.

En otra realización dicho acoplador L3 acopla la fórmula general (I) a la fórmula general (I) a la fórmula general (III), formando de ese modo un agente que tiene la fórmula general (V):

20 [Formula (I)] - [Acoplador L3] - [Formula (III)] (V)

En una realización, el agente es un péptido o péptido artificial, o un péptido sintético o una molécula mixta que comprende una parte y una parte no natural, dicho agente seleccionado del grupo que consiste en péptidos que tiene la Secuencia RRPYI(ciclohexil-glicina), yodoYIL, QIL, YCL, dYIL, YHL, RRPYI-1-amino-1-carboxiciclohexilo, RRPYI (N-metil-Leucina Y YIL, representado en la Figura 8.

25 En una realización el agente es RRPYI(ciclo-hexil-glicina) que se describe en la figura 8.

En una realización el agente es yodoYIL que se describe en la figura 8.

En una realización el agente es OIL que se describe en la figura 8.

En una realización el agente es YCL que se describe en la figura 8.

En una realización el agente es dYIL que se describe en la figura 8.

30 En una realización el agente es YHL que se describe en la figura 8.

En una realización el agente es RRPYI-1-amino-1-carboxiciclohexilo que se describe en la figura 8.

En una realización el agente es RRPYI(n-Metil-Leucina que se describe en la figura 8.

En una realización el agente es YIL que se describe en la figura 8.

### Anticuerpos

35 Un anticuerpo se une fuertemente a una molécula diana particular, inactivando de este modo directamente o marcándola para su destrucción. El anticuerpo reconoce su objetivo (antígeno) con una fuerza y especificidad

notable impuesto por la suma de muchas fuerzas químicas, incluyendo enlaces de hidrógeno, y fuerzas de van der Waals y hidrófobas, así como interacciones iónicas. En general, cuanto más complejo es químicamente el objetivo, más inmunogénico será el mismo. El determinante antigénico puede abarcar tramos de aminoácidos lineales cortos o un módulo de proteína en tres dimensiones más complicado.

- 5 Conceptualmente, los anticuerpos dirigidos contra un receptor diana pueden inhibir la unión al ligando de dos maneras: competitiva o alostérica. La inhibición competitiva implica la unión directa del anticuerpo a o cerca del sitio de unión del ligando en el receptor, desplazando de ese modo el ligando de su receptor o inhibiendo estéricamente el acercamiento del ligando al sitio de unión del ligando. La inhibición alostérica implica la unión del anticuerpo a un sitio en el polipéptido del receptor que es distinto del epítipo de unión al ligando. Sin embargo, la unión a este sitio  
10 inducirá un cambio conformacional en la estructura general del receptor que hace que sea más difícil o incluso imposible que el ligando se una a su sitio de reconocimiento del cognato.

También se describen anticuerpos o equivalentes funcionales de los mismos que reconocen específicamente y se unen a epítopos de receptores de dominio Vps10p, receptores TRPV y un tercer componente al que los dos componentes anteriores de un complejo ternario pueden unirse. Un ejemplo de un tercer epítipo es el receptor TrkA.

- 15 El anticuerpo o equivalente funcional del mismo puede ser cualquier anticuerpo conocido en la técnica, por ejemplo un anticuerpo policlonal o un anticuerpo monoclonal derivado de un mamífero o un anticuerpo sintético tal como un anticuerpo de cadena sencilla o híbridos que comprenden fragmentos de anticuerpos. Además, el anticuerpo puede ser mezclas de anticuerpos monoclonales o anticuerpos policlonales artificiales. Además, los equivalentes funcionales de anticuerpos pueden ser fragmentos de anticuerpos, en particular, fragmentos de unión a epítopos.  
20 Además, los anticuerpos o equivalente funcional de los mismos pueden ser una molécula pequeña que imita un anticuerpo. Los anticuerpos de origen natural son moléculas de inmunoglobulina que consisten en cadenas pesadas y livianas. En realizaciones preferentes el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

- Los anticuerpos monoclonales (Mab) son anticuerpos, en los que cada molécula de anticuerpo son similares y por lo tanto reconocen el mismo epítipo. Los anticuerpos monoclonales se producen en general por una línea de células de hibridoma. Los procedimientos de fabricación de anticuerpos monoclonales y células de hibridoma sintetizadoras de anticuerpos son bien conocidos para los expertos en la técnica. Los hibridomas productores de anticuerpos por ejemplo pueden prepararse mediante la fusión de un anticuerpo que produce linfocitos B con una línea celular de linfocitos B inmortalizada. Los anticuerpos monoclonales pueden prepararse por ejemplo como se describe en *Antibodies: A Laboratory Manual*, By Ed Harlow y David Lane, *Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988.* Dichos anticuerpos monoclonales pueden obtenerse de cualquier especie de mamífero adecuada, sin embargo  
30 frecuentemente los anticuerpos monoclonales serán anticuerpos de roedores por ejemplo anticuerpos monoclonales de rata o murinos. Se prefiere que los anticuerpos sean anticuerpos monoclonales o derivados de anticuerpos monoclonales.

- Los anticuerpos policlonales es una mezcla de moléculas de anticuerpo que reconocen un antígeno dado específico, los anticuerpos policlonales pueden por lo tanto reconocer diferentes epítopos del antígeno dentro de dicho antígeno. En general, los anticuerpos policlonales se purifican a partir de suero de un mamífero, que ha sido previamente inmunizado con el antígeno. Los anticuerpos policlonales pueden por ejemplo prepararse mediante cualquiera de los procedimientos descritos en *Antibodies: A Laboratory Manual*, By Ed Harlow y David Lane, *Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988.* Los anticuerpos policlonales se pueden obtener de cualquier especie de mamífero apropiada, por ejemplo ratones, ratas, conejos, burros, cabras, ovejas, vacas o camellos. El anticuerpo preferentemente no se obtiene de una especie no mamífero, es decir, el anticuerpo no es por ejemplo preferentemente un anticuerpo de pollo. El anticuerpo también puede ser por ejemplo un anticuerpo policlonal artificial como por ejemplo se describe en el documento US 5.789.208 o US 6.335.163.

- Los anticuerpos también pueden ser anticuerpos recombinantes. Los anticuerpos recombinantes son anticuerpos o fragmentos de los mismos o equivalentes funcionales de los mismos producidos utilizando tecnología recombinante. Por ejemplo los anticuerpos recombinantes puede producirse utilizando una biblioteca sintética o mediante presentación de fagos. Los anticuerpos recombinantes se pueden producir de acuerdo a cualquier procedimiento convencional, por ejemplo los procedimientos descritos en "Recombinant Antibodies", Frank Breitling, Stefan Dubel, Jossey-Bass, Septiembre de 1999.

- 50 Los anticuerpos también pueden ser anticuerpos biespecíficos, es decir, anticuerpos que reconocen específicamente dos epítopos diferentes. Los anticuerpos biespecíficos en general pueden ser preparados a partir de anticuerpos monoclonales, o a partir de anticuerpos recombinantes, pro ejemplo utilizando dos hibridomas con el fin de combinar su especificidad, por reticulación química o utilizando tecnologías recombinantes. Los anticuerpos también pueden ser anticuerpos triespecíficos.

- 55 Los equivalentes funcionales de anticuerpos pueden en una realización preferente ser un fragmento de un anticuerpo, preferentemente un fragmento de unión al antígeno o una región variable. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen fragmentos Fab, Fab', F (ab')<sub>2</sub> y Fv. La digestión con papaína de los anticuerpos produce dos fragmentos idénticos de unión a antígeno, llamado el fragmento Fab, cada uno con un solo sitio de unión a antígeno, y un fragmento residual "Fc", llamado así por su capacidad para cristalizarse fácilmente. El tratamiento con

pepsina produce un fragmento  $F(ab')_2$  que tiene dos fragmentos de unión a antígeno que son capaces de reticular el antígeno, y otro fragmento residual (que se denomina pFc'). Los fragmentos adicionales pueden incluir diacuerpos, anticuerpos lineales, moléculas de anticuerpo de cadena única, anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos. Como se emplea en la presente memoria "fragmento funcional" con respecto a los anticuerpos, se refiere a fragmentos Fv, F(ab) y  $F(ab')_2$ .

Los fragmentos de anticuerpos preferentes retienen alguna o esencialmente toda la capacidad de un anticuerpo para unirse selectivamente con su antígeno o receptor. Algunos fragmentos preferentes se definen de la siguiente manera :

(1) Fab es el fragmento que contiene un fragmento de unión a antígeno monovalente de una molécula de anticuerpo. Un fragmento Fab se puede producir mediante la digestión del anticuerpo entero con la enzima papaina para producir una cadena liviana intacta y una porción de una cadena pesada .

(2) Fab' es el fragmento de una molécula de anticuerpo y se puede obtener tratando el anticuerpo entero con pepsina, seguido por reducción, para producir una cadena liviana intacta y una porción de una cadena pesada. Dos fragmentos Fab' se obtienen por molécula de anticuerpo. Los fragmentos Fab 'difieren de los fragmentos Fab por la adición de unos pocos residuos en el extremo carboxilo del dominio CH1 de cadena pesada incluyendo una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo.

(3)  $(Fab' )_2$  es el fragmento de un anticuerpo que puede obtenerse tratando el anticuerpo entero con la enzima pepsina sin reducción posterior.  $F(ab')_2$  es un dímero de dos fragmentos Fab ' retenidos unidos por dos enlaces disulfuro.

(4) Fv es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un reconocimiento y sitio de unión de antígeno completo. Esta región consiste en un dímero de un dominio variable de cadena liviana y uno pesado en una estrecha asociación, no covalente (dímero VH-VL). Es en esta configuración que las tres CDRs de cada dominio variable interaccionan para definir un sitio de unión a antígeno en la superficie del dímero VH-VL. Colectivamente, las seis CDR confieren especificidad de unión a antígeno para el anticuerpo. Sin embargo, incluso un dominio variable simple (o la mitad de un Fv que comprende sólo tres CDR específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse al antígeno, aunque en una afinidad más baja que el sitio de unión completo.

En una realización el anticuerpo es un anticuerpo de cadena simple ("SCA"), definido como una molécula manipulada genéticamente que contiene la región variable de la cadena liviana, la región variable de la cadena pesada, unidas por un acoplador polipeptídico adecuado como una molécula de cadena simple fusionada genéticamente. Tales anticuerpos de cadena simple también son referidos como fragmentos de anticuerpos "Fv de cadena simple" o "scFv". En general, el polipéptido Fv además comprende un polipéptido acoplador entre los dominios VL y VH Y, que permite que scFv forme la estructura deseada para la unión a antígeno.

En otra realización el equivalente funcional de un anticuerpo es una molécula pequeña que imita un anticuerpo. Tales moléculas pueden ser miembros de unión a inmunoglobulina. Así, el polipéptido epítipo de la presente invención puede obtenerse de una proteína o polipéptido de origen natural; dicha proteína o polipéptido por ejemplo puede ser diseñado de novo, o puede ser seleccionado de una biblioteca. El miembro de unión puede ser un solo resto, por ejemplo, un polipéptido o dominio de proteína, o puede incluir dos o más restos, por ejemplo, un par de polipéptidos tal como un par de polipéptidos. El polipéptido de unión puede ser por ejemplo, pero no exclusivamente, una lipocalina, una molécula MHC de cadena simple, una Anticalin (Pieris), un Affibody™, o un Trinectin™ (Phylos), nanocuerpos (Ablynx). El miembro de unión puede ser seleccionado o diseñado por procedimientos recombinantes conocidos por personas bien conocidas en la técnica.

#### *Anticuerpos humanos*

Los anticuerpos monoclonales humanos pueden ser producidos por una variedad de técnicas, incluyendo la metodología convencional de anticuerpos monoclonales, por ejemplo, la técnica de hibridación de células somáticas convencional de Kohler y Milstein, Nature 256:495 (1975). Aunque se prefieren procedimientos de hibridación de células somáticas, en principio, se pueden emplear otras técnicas para producir anticuerpo monoclonal, por ejemplo, transformación viral u oncogénica de linfocitos B o técnicas de presentación en fagos utilizando bibliotecas de genes de anticuerpos humanos

#### *Epítopos de unión para anticuerpos en el receptor de dominio Vps10p Sortilina*

En una realización preferente, el agente es un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en: anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, anticuerpos humanizados, anticuerpos de cadena simple, anticuerpos recombinantes, fragmentos de anticuerpos incluyendo fragmentos Fab

En una realización preferente el anticuerpo está dirigido contra un parte extracelular del receptor de dominio Vps10p. Esta realización es útil tanto in vivo como in vitro.

En otra realización, el anticuerpo está dirigido al dominio intracelular del receptor de dominio Vps10p. Esta

realización es particularmente útil para fines in vitro.

En otra realización, el receptor de dominio Vps10p se selecciona del grupo que consiste en Sortilina (SEC ID NO.: 1), SorLA (SEC ID NO.: 2), SorCS1 (SEC ID NO.: 3), SorCS2 (SEC ID NO.: 4) y SorCS3 (SEC ID NO.: 5).

En una realización preferente el receptor de dominio Vps10p es Sortilina (SEC ID NO.: 1).

5 En una realización, los anticuerpos monoclonales humanos están dirigidos contra un epítipo que comprende los residuos de aminoácidos R325, S316, Y351, I353, K260, I327, F314, F350 a M363, S305, F306, T398 a G400, I303-G309, Q349-A356, Y395 y T402 de SEC ID NO. 1 o un fragmento unido a membrana o soluble o variante del mismo.

10 En otra realización, los anticuerpos monoclonales humanos están dirigidos contra un epítipo que comprende los residuos de aminoácidos R325, S316, Y351, I353, K260, I327, F314, F350 a M363, S305, F306 y T398 a G400 de SEC ID NO. 1 o un fragmento unido a membrana o soluble o variante del mismo.

En otra realización, los anticuerpos monoclonales humanos están dirigidos contra un epítipo que comprende los residuos de aminoácidos R325, S316, Y351, I353, K260, I327, F314 y F350 a M363 de SEC ID NO. 1 o un fragmento unido a membrana o soluble o variante del mismo.

15 En otra realización, los anticuerpos monoclonales humanos están dirigidos contra un epítipo que comprende los residuos de aminoácidos L572, L114, V112, R109 a S111, S115 a G118, T570, G571, W586, W597, T168-1174, L572, A573 y S584 a F588 de SEC ID NO. 1 o un fragmento unido a membrana o soluble o variante del mismo.

20 En otra realización, los anticuerpos monoclonales humanos están dirigidos contra un epítipo que comprende los residuos de aminoácidos L572, L114, V112, R109 a S111, S115 a G118, T570, G571, W586 y W597 de SEC ID NO. 1 o un fragmento unido a membrana o soluble o variante del mismo.

25 En otra realización, los anticuerpos monoclonales humanos están dirigidos contra un epítipo que comprende los residuos de aminoácidos L572, L114 y V112 de SEC ID NO. 1. En otra realización, los anticuerpos monoclonales humanos están dirigidos contra un epítipo que comprende los residuos de aminoácidos D403, S420, D422, N423, S424, I425, E426, T451, Y466, E470, I498, S499 y V500 de SEC ID NO. 1 o un fragmento unido a membrana o soluble o variante del mismo.

En otra realización, los anticuerpos monoclonales humanos están dirigidos contra un epítipo que comprende los residuos de aminoácidos D403, N423, S424, I425, T451, Y466, I498 y V500 de SEC ID NO. 1 o un fragmento unido a membrana o soluble o variante del mismo.

30 En otra realización, los anticuerpos monoclonales humanos están dirigidos contra un epítipo que comprende los residuos de aminoácidos T451, Y466, I498 y V500 de SEC ID NO. 1 o un fragmento unido a membrana o soluble o variante del mismo.

En una realización importante, el anticuerpo es seleccionado de los anticuerpos que se describen en la tabla 1.

35 Por consiguiente, los anticuerpos pueden seleccionarse de, pero sin limitarse a anticuerpos seleccionados del grupo que consiste en dominio antiextracelular de cabra de anticuerpo de SorLA humana, dominio anticitoplasmático de conejo de anticuerpo de SorLA humana, repetición anticomplementaria de conejo de anticuerpo de SorLA humana, dominio antiextracelular de conejo de anticuerpo de SorLA humana, dominio anticitoplasmático de conejo de anticuerpo de SorLA humana, dominio anti-Vps10p de conejo de anticuerpo de SorLA humana, secuencia anti-peptídica de conejo en dominio Vps10p de anticuerpo de SorLA humana, anti-C-terminal de conejo de anticuerpo de SorLA humana, cola anticitoplasmática de conejo de anticuerpo de SorLA humana, dominio antiextracelular de ratón de anticuerpo de SorLA humana, dominio antiextracelular de conejo de anticuerpo de Sortilina humana, dominio anticitoplasmático de conejo de anticuerpo de Sortilina humana, anti-propéptido de conejo de anticuerpo de Sortilina humana, dominio anti-Vps10p de conejo de anticuerpo de Sortilina humana, dominio antiextracelular de cabra de Sortilina humana, dominio antiextracelular de ratón de anticuerpo de Sortilina humana, dominio antiextracelular de cabra de anticuerpo de SorCS1 humana, dominio antiextracelular de conejo de anticuerpo de SorCS1 humana, dominio rico en antileucina de anticuerpo de SorCS1 humana, dominio antiextracelular de oveja de anticuerpo de SorCS2 humana, dominio antiextracelular de cabra de anticuerpo de SorCS2 humana, dominio antiextracelular de conejo de anticuerpo de SorCS2 humana, aminoácidos del extremo terminal C anti-28 de conejo de anticuerpo de SorCS2 humana, anti-propéptido de conejo de anticuerpo de SorCS2 humana, dominio antiextracelular de ratón de SorCS2 humana, aminoácidos del extremo terminal C anti-15 de conejo de anticuerpo de SorCS3 humana, dominio anti-N-terminal de conejo de anticuerpo de SorCS3 humana, dominio antiextracelular de conejo de SorCS3 humana, dominio antiextracelular de ratón de SorCS3 humana y dominio antiextracelular de cabra de anticuerpo de SorCS3 humana, o una combinación de los anteriores.

En una realización, el anticuerpo está dirigido contra el receptor Trpv.

En otra realización, el anticuerpo está dirigido contra el receptor TrkA.

La persona experta en la técnica de la producción de anticuerpos, puede, sobre la base de la información proporcionada más arriba, a su discreción producir un anticuerpo capaz de inhibir el dolor.

#### *Inmunizaciones*

5 Para generar anticuerpos monoclonales completamente humanos contra los epítomos de interés para la presente invención, los ratones transgénicos o transcromosomales que contienen genes de inmunoglobulina humana (por ejemplo, ratones HCo12, HCo7 o KM) pueden inmunizarse con una preparación enriquecida del antígeno y/o células que expresan los epítomos de receptores diana, como se describe, por ejemplo, por Lonberg et al. (1994), supra; Fishwild et al. (1996), supra, y el documento WO 98/24884. Por otra parte, los ratones pueden ser inmunizados con ADN que codifica el epítomo CAOU-1. Preferentemente, los ratones tendrán 6-16 semanas de edad en la primera infusión.

15 La experiencia acumulada con diversos antígenos ha demostrado que los ratones transgénicos HuMAb responden mejor cuando se inmunizan inicialmente por vía intraperitoneal (ip) o por vía subcutánea (sc) con células que expresan el antígeno en adyuvante completo de Freund, seguido por inmunizaciones i.p semana de por medio (hasta un total de 10) con las células que expresan el antígeno en PBS. La respuesta inmunitaria puede monitorizarse durante el transcurso del protocolo de inmunización con muestras de plasma que se obtienen por sangrados retroorbitales. El plasma puede cribarse mediante análisis FACS, y los ratones con títulos suficientes de inmunoglobulina humana anti-antígeno pueden usarse para fusiones. Los ratones pueden ser impulsados por vía intravenosa con células que expresan el antígeno por ejemplo 4 y 3 días antes del sacrificio y la extirpación del bazo.

#### *Uso de secuencias de anticuerpos parciales para expresar anticuerpos intactos*

20 Los anticuerpos interactúan con antígenos diana predominantemente a través de residuos de aminoácidos que se encuentran en las seis regiones determinantes de complementariedad (CDR) de cadena liviana y pesada. Por esta razón, las secuencias de aminoácidos dentro de CDR son más diversas entre anticuerpos individuales que las secuencias fuera de las CDR. Debido a que las secuencias de CDR son responsables de la mayoría de las interacciones anticuerpo-antígeno, es posible expresar anticuerpos recombinantes que imitan las propiedades de anticuerpos de origen natural específicos mediante la construcción de vectores de expresión que incluyen secuencias de CDR de los anticuerpos de origen natural específicos injertados en secuencias marco de un anticuerpo diferente con diferentes propiedades (véase, por ejemplo, Riechmann, L. et al. (1998) *Nature* 332:323-327; Jones, P. et al. (1986) *Nature* 321:522-525; y Queen, C. et al. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:10029-10033). Tales secuencias marco se pueden obtener a partir de bases de datos de ADN públicas que incluyen las secuencias génicas de anticuerpos de línea germinal. Estas secuencias de línea germinal diferirán de las secuencias génicas de anticuerpos maduros porque no incluirán genes variables completamente ensamblados, que se forman por la unión V(D)J durante la maduración de células B. Las secuencias génicas de línea germinal también diferirán de las secuencias de un anticuerpo repertorio secundario de alta afinidad que contiene mutaciones en todo el gen variable, pero normalmente agrupados en las CDR. Por ejemplo, las mutaciones somáticas son relativamente infrecuentes en la parte amino terminal de la región marco 1 y en la porción carboxi-terminal de la región marco 4. Por esta razón, no es necesario obtener toda la secuencia de ADN de un anticuerpo particular con el fin de recrear un anticuerpo recombinante intacto que tiene propiedades similares a aquellas del anticuerpo original (véase el documento WO 99/45962). Las secuencias de cadena liviana y cadena pesada que abarca las regiones CDR suele ser suficiente para este propósito. La secuencia parcial se utiliza para determinar qué segmentos de genes de unión y variables de línea germinal contribuyeron con los genes variables de anticuerpo recombinado. La secuencia de línea germinal se usa entonces para suplir la falta de partes de las regiones variables. Las secuencias líderes de cadena liviana y pesada se escinden durante la maduración de la proteína y no contribuyen con las propiedades del anticuerpo final. Para añadir secuencias que faltan, las secuencias de ADNc clonado se pueden combinar con oligonucleótidos sintéticos por ligación o amplificación por PCR. Alternativamente, la región variable completa puede sintetizarse como un conjunto de oligonucleótidos cortos que se superponen y combinarse por amplificación por PCR para crear un clon de región variable completamente sintético. Este proceso tiene ciertas ventajas tal como la eliminación o inclusión de sitios de restricción particulares, o la optimización de codones particulares.

50 Las secuencias de nucleótidos de transcripciones de cadena liviana y pesada de hibridomas se utilizan para diseñar un conjunto de superposición de oligonucleótidos sintéticos para crear secuencias V sintéticas con capacidades de codificación de aminoácidos idénticas como las secuencias naturales. Las secuencias de cadena kappa y pesada sintética pueden diferir de las secuencias naturales de tres maneras: las hebras de bases de nucleótidos repetidas se interrumpen para facilitar la síntesis de oligonucleótidos y la amplificación por PCR; sitios óptimos de iniciación de traducción óptimos se incorporan de acuerdo las reglas de Kozak (Kozak, 1991, *J. Biol. Chem.* 266:19867-19870); y los sitios HindIII se manipulan genéticamente corriente arriba de los sitios de iniciación de la traducción.

Para ambas regiones variables de cadena liviana y pesada, las secuencias de hebra codificantes optimizadas y correspondientes no codificantes se descomponen en 30-50 nucleótidos aproximadamente en el punto medio del oligonucleótido no codificante correspondiente. Por lo tanto, para cada cadena, los oligonucleótidos pueden ser

ensamblados en conjuntos de hebra doble de superposición que abarcan segmentos de 150-400 nucleótidos. Las combinaciones se utilizan entonces como plantillas para producir productos de amplificación por PCR de 150 a 400 nucleótidos. Por lo general, un conjunto de oligonucleótidos de región variable simple se descompone en dos combinaciones que son amplificadas por separado para generar dos productos PCR de superposición. Estos productos solapantes se combinan a continuación mediante amplificación por PCR para formar la región variable completa. También puede ser deseable incluir un fragmento de la superposición de la región constante de cadena pesada o liviana (incluyendo el sitio BbsI de la cadena liviana kappa, o el sitio de AgeI de la cadena pesada gamma) en la amplificación por PCR para generar fragmentos que pueden ser fácilmente clonados en las construcciones de vectores de expresión.

Las regiones variables de cadena pesada y liviana reconstruidas se combinan entonces con secuencias promotoras clonadas, líderes, de iniciación de traducción, de región constante, no traducidas 3', de poliadenilación, y terminación de la transcripción para formar construcciones de vectores de expresión. Las construcciones de expresión de cadena liviana y pesada se pueden combinar en un único vector, ser co-transfectadas, transfectadas en serie, o transfectadas por separado en células huésped que a continuación se fusionan para formar una célula huésped que expresa ambas cadenas

#### *Anticuerpos monovalentes*

El polipéptido de unión monoespecífico puede ser monovalente, es decir, que tiene sólo un dominio de unión.

Para un anticuerpo monovalente, las secuencias de residuos de aminoácidos de dominio constante de inmunoglobulina comprenden las partes estructurales de una molécula de anticuerpo conocidas en la técnica como CH1, CH2, CH3 y CH4. Son preferentes los polipéptidos de unión que se conocen en la técnica como C<sub>L</sub>. Los polipéptidos C<sub>L</sub> preferentes se seleccionan del grupo que consiste en C<sub>kappa</sub> y C<sub>lambda</sub>.

Además, en la medida en que el dominio constante puede ser un dominio constante de cadena pesada o liviana (C<sub>H</sub> o C<sub>L</sub>, respectivamente), una variedad de composiciones de polipéptidos de unión monovalentes es contemplada por la presente invención. Por ejemplo, los dominios constantes de cadena liviana son capaces de formar un puente de disulfuro a otro cualquier dominio constante de cadena liviana o a un dominio constante de cadena pesada. En contraste, un dominio constante de cadena pesada puede formar dos puentes disulfuro independientes, lo que permite la posibilidad de formar un puente a tanto otra cadena pesada y a una cadena liviana, o para formar polímeros de cadenas pesadas.

Por lo tanto, en otra realización, se describe un polipéptido de unión monovalente aislado en el que el dominio de cadena constante C tiene un residuo de cisteína capaz de formar al menos un puente disulfuro, y donde al menos dos polipéptidos monovalentes están covalentemente unidos por dicho puente disulfuro.

En realizaciones preferentes, el dominio de cadena constante C puede ser C<sub>L</sub> o C<sub>H</sub>. Donde C es C<sub>L</sub>, el polipéptido C<sub>L</sub> es preferentemente seleccionado del grupo que consiste en C<sub>kappa</sub> y C<sub>lambda</sub>.

En otra realización, se describe una composición de polipéptidos de unión que comprende un polipéptido monovalente como más arriba, excepto que C es C<sub>L</sub> que tiene un residuo de cisteína capaz de formar un puente disulfuro, tal que la composición contiene dos polipéptidos monovalentes unidos covalentemente por dicho puente disulfuro.

#### *Multiespecificidad, incluyendo biespecificidad*

En una realización preferente, se describen polipéptidos de unión multiespecíficos, que tienen afinidad para y son capaces de unirse a al menos dos entidades diferentes. Los polipéptidos de unión multiespecíficos pueden incluir polipéptidos de unión biespecíficos.

En una realización la molécula multiespecífica es un anticuerpo biespecífico (BsAb), que lleva al menos dos dominios de unión diferentes, donde preferentemente al menos uno de los cuales es de origen anticuerpo.

Una molécula biespecífica también puede ser una molécula biespecífica de cadena simple, tal como un anticuerpo biespecífico de cadena simple, una molécula biespecífica de cadena simple que comprende un anticuerpo de cadena simple y un dominio de unión, o una molécula biespecífica de cadena simple que comprende dos dominios de unión. Las moléculas multiespecíficas también pueden ser moléculas de cadena simple o pueden comprender al menos dos moléculas de cadena simple.

Los anticuerpos multiespecíficos incluyendo los biespecíficos, pueden producirse mediante cualquier manera adecuada conocida por la persona experta en la técnica.

El enfoque tradicional para generar anticuerpos completos biespecíficos era fusionar dos líneas celulares de hibridoma que producen cada una un anticuerpo que tiene la especificidad deseada. Debido a la asociación aleatoria de cadenas liviana y pesada de inmunoglobulina, estos hibridomas híbridos producen una mezcla de hasta 10 combinaciones diferentes de cadena liviana y pesada, sólo una de las cuales es el anticuerpo biespecífico. Por lo

tanto, estos anticuerpos biespecíficos tienen que ser purificados con procedimientos engorrosos, que disminuyen considerablemente el rendimiento del producto deseado.

Enfoques alternativos incluyen la unión in vitro de dos especificidades de antígeno por entrecruzamiento químico de restos de cisteína, ya sea en la bisagra o a través de una Cys del extremo terminal C genéticamente introducida como se describe más arriba. Una mejora de dicho ensamblaje in vitro se logró utilizando fusiones recombinantes de Fab con péptidos que promueven la formación de heterodímeros. Sin embargo, el rendimiento de producto biespecífico en estos procedimientos es mucho menor que 100%.

Un enfoque más eficiente para producir fragmentos de anticuerpos bivalentes o biespecíficos, que no impliquen etapas de ensamblaje químico in vitro, descrito por Holliger et al. (1993). Este enfoque tiene la ventaja de la observación de que los scFv secretada a partir de bacterias están a menudo presentes como monómeros y dímeros. Esta observación sugirió que el  $V_H$  y  $V_L$  de diferentes cadenas podrían asociarse, formando de este modo dímeros y complejos más grandes. Los fragmentos de anticuerpos diméricos, también llamados "diacuerpos" por Holliger et al., son en realidad pequeños fragmentos de anticuerpos bivalentes que se ensamblaron in vivo. Mediante la unión de  $V_H$  y  $V_L$  de dos anticuerpos diferentes 1 y 2, para formar cadenas "cruzadas"  $V_H 1V_L 2$  y  $V_H 2-V_L 1$ , se muestra el proceso de dimerización para volver a ensamblar sitios de unión a antígeno. La afinidad de los dos sitios de unión ha demostrado ser igual que los scFv de inicio, o incluso ser 10 veces mayor cuando se extrajo el acoplador de polipéptido que une covalentemente  $V_H$  y  $V_L$ , generando así dos proteínas consistiendo cada una en  $V_H$  directamente y covalentemente unido a  $V_L$  sin apareamiento con  $V_H$ . Esta estrategia de producir fragmentos de anticuerpos biespecíficos también fue descrita en varias solicitudes de patentes. La solicitud de patente WO 94 / 09131 (SCOTGEN LTD ; fecha de prioridad 15 de octubre 1992) se refiere a una proteína de unión biespecífica en la que los dominios de unión se obtienen de la región  $V_H$  y  $V_L$  presentes en dos cadenas o unidos en un scFv, mientras que otros dominios de anticuerpos fusionados, por ejemplo, dominios constantes de extremo terminal C, se utilizan para estabilizar las construcciones diméricas. La solicitud de patente WO 94/13804 (Cambridge Antibody Technology / Consejo de Investigación Médica, primera fecha de prioridad 4 de diciembre 1992) se refiere un polipéptido que contiene un  $V_H$  y un  $V_L$  que son incapaces de relacionarse con los demás, por lo que los dominios V se pueden conectar con o sin un acoplador.

Mallender y Voss, 1994 (también describió en la solicitud de patente WO 94/13806; DOW CHEMICAL CO; fecha de prioridad 11 de diciembre de 1992) informó acerca de la producción in vivo de un fragmento de anticuerpo biespecífico de cadena simple en E. coll. La biespecificidad de la proteína bivalente se basó en dos moléculas de scFV monovalentes producidas previamente que poseían distintas especificidades, estando unidas entre sí en el nivel genético por un acoplador de polipéptido flexible. Tradicionalmente, siempre que los fragmentos de anticuerpos de cadena simple son referidos, está involucrada una molécula simple que consiste en una cadena pesada unida a una cadena liviana (correspondiente) de presencia o ausencia de un acoplador polipéptido. Al hacer fragmentos de anticuerpos bivalentes o biespecíficos a través de la metodología de "diacuerpo" (Holliger et al., (1993) y solicitud de patente WO 94/09131) o por la metodología de "Doble scFv" (Mallender y Voss, 1994 y patente la solicitud WO 94/13806), nuevamente  $V_H$  está ligado a un  $V_L$  (correspondiente).

Las moléculas multiespecíficas descritas más arriba pueden fabricarse mediante varios procedimientos. Por ejemplo, todas las especificidades pueden ser codificadas en el mismo vector y, expresadas y ensambladas en la misma célula huésped. Este procedimiento es particularmente útil cuando la molécula multiespecífica es un mAb X mAb, mAb X Fab, Fab X  $F(ab')_2$  o proteína de fusión Fab X ligando. Varios otros procedimientos para preparar anticuerpos bivalentes o multivalentes por ejemplo se describen en las Patentes Estadounidenses Nos. 5.260.203; 5,455,030; 4,881,175; 5.132.405; 5.091.513; 5,476,786; 5,013,653; 5.258.498; y 5.482.858.

Utilizando un polipéptido de unión biespecífico o multiespecífico de acuerdo a la invención, la invención ofrece varias ventajas en comparación con los polipéptidos de unión mono-específicos / monovalentes.

Se puede preferir que el al menos otro dominio de unión sea capaz de unirse a una célula inmunoactiva, tal como un leucocito, un macrófago, un linfocito, una célula basofílica, y/o una célula eosinofílica, con el fin de aumentar el efecto del polipéptido de unión en un procedimiento terapéutico. Esto se puede lograr mediante el establecimiento de que el al menos otro dominio de unión sea capaz de unirse específicamente a una proteína de mamífero, tal como una proteína humana, tal como una proteína seleccionada de cualquiera de las proteínas de diferenciación de agrupamiento (CD), en particular, CD64 y/o CD89. Se describe un procedimiento para producir anticuerpos biespecíficos que tienen especificidad CD64 en US 6.071.517 para Medarex, Inc.

La producción y caracterización de estos anticuerpos monoclonales preferidos son descritos por Fanger et al. en el documento WO 88/00052 y en US 4.954.617. Estos anticuerpos se unen a un epítipo de FcyRI, FcyRII o FcyRIII en un sitio que es distinto del sitio de unión Fcy del receptor y, por lo tanto, su unión no se bloquea sustancialmente por los niveles fisiológicos de IgG. Los anticuerpos anti-FcyRI específicos útiles en esta invención son mAb 22, mAb 32, mAb 44, mAb 62 y mAb 197. En otras formas de realización, el anticuerpo receptor anti-Fcy es una forma humanizada del mAb 22 (H22). La producción y caracterización del anticuerpo H22 se describe en Graziano, RF et al. (1995) J. Immunol. 155 (10) :4996-5002 y el documento WO 94/10332. La línea celular que produce el anticuerpo H22 fue depositado en American Type Culture Collection el 4 de noviembre de 1992 bajo la denominación HA022CL1 y tiene el número de acceso CRL 11177.

En todavía otras realizaciones preferentes, la especificidad de unión para un receptor Fc es proporcionada por un anticuerpo que se une a un receptor IgA humano, por ejemplo, un receptor Fc $\alpha$  (Fc $\alpha$ 1 (CD89)), cuya unión preferentemente no es bloqueada por la inmunoglobulina A humana (IgA). El término "receptor de IgA" pretende incluir el producto génico de un gen  $\alpha$  (Fc $\alpha$ RI) localizado en el cromosoma 19. Este gen es conocido por codificar varias isoformas transmembrana alternativamente empalmadas de 55 a 110 kDa. Fc $\alpha$ RI (CD89) se expresa constitutivamente en monocitos / macrófagos, granulocitos eosinofílicos y neutrofílicos, pero no en poblaciones de células no efectoras. Fc $\alpha$ RI tiene afinidad para tanto IgA1 y IgA2, que se incrementa con la exposición a citocinas tal como G-CSF o GM-CSF (Morton, HC et al. (1996) *Critical Reviews in Immunology* 16:423-440). Cuatro anticuerpos monoclonales Fc $\alpha$ RI específicos, identificados como A3, A59, A62 y A77, que se unen a Fc $\alpha$ RI fuera del dominio de unión a ligando IgA, han sido descritos (Monteiro, R.C. et al. (1992) *J. Immunol.* 148:1764).

Fc $\alpha$ RI, Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RII y Fc $\gamma$ RIII, especialmente Fc $\gamma$ RII y Fc $\gamma$ RIII, son receptores activadores preferentes para su uso en la invención porque (1) se expresan principalmente en las células efectoras inmunes, por ejemplo, monocitos, PMN, macrófagos y células dendríticas; (2) se expresan en niveles altos (por ejemplo, 5.000-100.000 por célula); (3) son mediadores de las actividades citotóxicas (por ejemplo, ADCC, fagocitosis); y (4) median presentación de antígenos mejorados de antígenos, incluyendo antígenos propios, dirigidos a los mismos.

Si bien se prefieren anticuerpos monoclonales humanos, otros anticuerpos que pueden ser empleados en las moléculas biespecíficas o multiespecíficas de la invención son anticuerpos murinos, quiméricos y humanizados monoclonales. Tales anticuerpos monoclonales murinos, quiméricos y humanizados se pueden preparar por procedimientos conocidos en la técnica.

Las moléculas multiespecíficas y biespecíficas se pueden fabricar utilizando técnicas químicas (véase por ejemplo, DM Kranz et al. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 78:5807), técnicas de "polidoma" (véase US 4.474.893), o técnicas de ADN recombinante.

Cuando las especificidades de unión son anticuerpos, los mismos pueden conjugarse a través de la unión de sulfhidrilo de las regiones bisagra del extremo terminal C de las dos cadenas pesadas. En una realización particularmente preferente, la región bisagra se modifica para contener un número impar de residuos sulfhidrilo, preferentemente uno, antes de la conjugación.

Alternativamente, ambas especificidades de unión pueden codificarse en el mismo vector y expresarse y ensamblarse en la misma célula huésped. Este procedimiento es particularmente útil cuando la molécula biespecífica y multiespecífica es un mAb x mAb, mAb x Fab, Fab x F(ab')<sub>2</sub> o proteína de fusión Fab X ligando. Una molécula biespecífica y multiespecífica de la invención, por ejemplo, una molécula biespecífica puede ser una molécula de cadena simple, tal como un anticuerpo biespecífico de cadena simple, una molécula biespecífica de cadena simple que comprende un anticuerpo de cadena simple y un determinante de unión, o una molécula biespecífica de cadena simple que comprende dos determinantes de unión. Las moléculas multiespecíficas y biespecíficas también pueden ser moléculas de cadena simple o pueden comprender al menos dos moléculas de cadena simple. Los procedimientos para preparar moléculas bi y multiespecíficas se describen por ejemplo en US 5,260,203; US 5,455,030; US 4,881,175; US 5,132,405; US 5,091,513; US 5,476,786; US 5,013,653; US 5,258,498; y US 5,482,858.

La unión de las moléculas biespecíficas y multiespecíficas a sus objetivos específicos pueden confirmarse por un ensayo de inmunoabsorción ligada a enzimas (ELISA), un radioinmunoensayo (RIA), análisis de FACS, un bioensayo (por ejemplo, inhibición del crecimiento), o un Ensayo Western Blot. Cada uno de estos ensayos generalmente detecta la presencia de complejos de proteína-anticuerpo de interés particular empleando un reagente etiquetado (por ejemplo, un anticuerpo) específico para el complejo de interés. Por ejemplo, los complejos FcR-anticuerpo pueden ser detectados utilizando por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo unido a enzimas que reconoce y se une específicamente a los complejos anticuerpo - FcR. Alternativamente, los complejos pueden ser detectados utilizando cualquiera de una variedad de otros inmunoensayos. Por ejemplo, el anticuerpo puede ser etiquetado radiactivamente y utilizado en un radioinmunoensayo (RIA) (véase, por ejemplo, Weintraub, B., *Principles of Radioimmunoassays, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques*, The Endocrine Society, marzo de 1986). El isótopo radiactivo puede detectarse por medios tales como el uso de un contador o un contador de centelleo o por autorradiografía.

#### 50 *Marco de anticuerpo humanizado*

No siempre es deseable utilizar anticuerpos no humanos para la terapia humana, puesto que los epítomos "foráneos" no humanos pueden provocar respuesta inmune en el individuo que debe ser tratado. Para eliminar o minimizar los problemas asociados con los anticuerpos no humanos, es deseable diseñar derivados de anticuerpos quiméricos, es decir, moléculas de anticuerpo "humanizadas" que combinan determinantes de unión a la región variable de Fab no humana con una región constante humana (Fc). Tales anticuerpos se caracterizan por especificidad de antígeno equivalente y afinidad de los anticuerpos monoclonales y policlonales descritos más arriba, y son menos inmunogénicos cuando se administran a seres humanos, y por lo tanto, más propensos a ser tolerados por el individuo que debe ser tratado.

Por consiguiente, en una realización el polipéptido de unión tiene un dominio de unión portado en un marco de anticuerpo humanizado, también llamado un anticuerpo humanizado.

Los anticuerpos humanizados son, en general, anticuerpos quiméricos que comprenden regiones derivadas de un anticuerpo humano y regiones derivadas de un anticuerpo no humano, tal como un anticuerpo de roedor. Humanización (también llamada remodelación o injerto de CDR) es una técnica bien establecida para reducir la inmunogenicidad de anticuerpos monoclonales (mAb) a partir de fuentes xenogénicas (comúnmente roedores), incrementando la homología con una inmunoglobulina humana, y para mejorar su activación del sistema inmune humano. Por lo tanto, los anticuerpos humanizados son típicamente anticuerpos humanos en los que algunos residuos de CDR y posiblemente algunos residuos marco están sustituidos por residuos de sitios análogos en anticuerpos de roedores.

Es importante que los anticuerpos humanizados conserven alta afinidad para el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para lograr este objetivo, de acuerdo a un procedimiento preferido, los anticuerpos humanizados se preparan mediante un proceso de análisis de las secuencias parentales y diversos productos humanizados conceptuales utilizando modelos tridimensionales de las secuencias humanizadas y parentales. Los modelos de inmunoglobulina tridimensionales están comúnmente disponibles y son familiares para los expertos en la técnica. Los programas informáticos disponibles que ilustran y muestran las probables estructuras conformacionales tridimensionales de secuencias de inmunoglobulinas candidatas seleccionadas. La inspección de estas presentaciones permite el análisis del papel probable de ciertos residuos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de residuos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse a su antígeno. De esta manera, los residuos de FR se pueden seleccionar y combinar a partir de las secuencias de importación y receptoras de manera que la característica del anticuerpo deseado, tal como un incremento en la afinidad para el/los antígeno/s objetivo, se maximice, a pesar de que son los residuos de CDR los que afectan directamente y mucho más sustancialmente la unión al antígeno.

Un procedimiento para humanizar MAbs relacionados con la producción de anticuerpos quiméricos en los que un sitio de unión a antígeno que comprende los dominios variables completos de un anticuerpo están fusionados a los dominios constantes derivados de un segundo anticuerpo, preferentemente un anticuerpo humano. Los procedimientos para llevar a cabo tales procedimientos de quimerización se describen por ejemplo en los documentos EP-A-O 120 694 (Celltech Limited), EP-A-O 125 023 (Genentech Inc.), EP-A-O 171 496 (Res. Dev. Corp. Japan), EP-A-0173494 (Stanford University) y EP-A-O 194 276 (Celltech Limited). Una forma más compleja de humanización de un anticuerpo implica el re-diseño del dominio de región variable de modo que los aminoácidos que constituyen el sitio de unión del anticuerpo no humano se integran en el marco de una región variable de anticuerpo humano (Jones et al., 1986).

El anticuerpo humanizado puede fabricarse por cualquier procedimiento capaz de reemplazar de al menos una porción de una CDR de un anticuerpo humano con una CDR derivada de un anticuerpo no humano. Winter describe un procedimiento que se puede usar para preparar los anticuerpos humanizados de la presente invención (Solicitud de patente del Reino Unido GB 2188638A, presentada el 26 de marzo, 1987), cuyo contenido se incorpora expresamente por referencia. Las CDR humanas pueden ser reemplazadas con CDR no humanas utilizando mutagénesis dirigida al sitio de oligonucleótidos como se describe en los siguientes ejemplos.

Como ejemplo, el anticuerpo humanizado puede fabricarse como se describe en la breve explicación a continuación. Los anticuerpos humanizados se pueden producir mediante el siguiente proceso:

(a) construir, mediante técnicas convencionales, un vector de expresión que contiene un operón con una secuencia de ADN que codifica una cadena pesada de anticuerpo en la que las CDR y tales partes mínimas de la región de marco de dominio variable que se requieren para retener la especificidad de unión de anticuerpos se obtienen de una inmunoglobulina no humana, y las partes restantes de la cadena de anticuerpo se obtienen de una inmunoglobulina humana, produciendo de este modo el vector de la invención;

(b) construir, mediante técnicas convencionales, un vector de expresión que contiene un operón con una secuencia de ADN que codifica una cadena liviana de anticuerpo complementario en el que las CDRs y tales porciones mínimas de la región marco de dominio variable que se requieren para mantener la especificidad de unión del anticuerpo donante se obtienen de una inmunoglobulina no humana, y las partes restantes de la cadena de anticuerpo se obtienen de una inmunoglobulina humana, produciendo de este modo el vector de la invención;

(c) transfectar los vectores de expresión en una célula huésped por técnicas convencionales para producir la célula huésped transfectada de la invención; y

(d) cultivar la célula transfectada mediante técnicas convencionales para producir el anticuerpo humanizado de la invención.

La célula huésped puede ser co-transfectada con los dos vectores, conteniendo el primer vector un operón que codifica una cadena ligera derivada de polipéptido y conteniendo el segundo vector un operón que codifica una cadena pesada derivada de un polipéptido. Los dos vectores contienen diferentes marcadores de detección, pero de

otra manera, aparte de las secuencias codificadoras de cadena liviana y pesada de anticuerpo, son preferentemente idénticos, para garantizar, en la medida de lo posible, la igualdad de expresión de los polipéptidos de cadena liviana y pesada. Alternativamente, un vector simple puede ser utilizado, incluyendo el vector secuencias que codifican polipéptidos de cadena liviana y pesada. Las secuencias codificantes para las cadenas pesada y liviana pueden comprender ADNc o ADN genómico o.

La célula huésped utilizada para expresar el anticuerpo alterado puede ser una célula bacteriana tal como E. coli, o una célula eucariota. En particular, se puede utilizar una célula de mamífero de un tipo bien definido para este propósito, tal como una célula de mieloma o una célula de ovario de hámster chino.

Los procedimientos generales por los que los vectores se pueden construir, los procedimientos de transfección requeridos para producir el huésped y los procedimientos de cultivo necesarios para producir el anticuerpo de la invención a partir de tales células huésped son todas técnicas convencionales. Del mismo modo, una vez producidos, los anticuerpos humanizados pueden purificarse de acuerdo a los procedimientos estándar como se describe a continuación.

*Marco de anticuerpo humano*

En una realización más preferente se describe un polipéptido de unión, en el que el dominio de unión es portado por un marco de anticuerpo humano, es decir, en el que los anticuerpos tienen un mayor grado de secuencias peptídicas humanas que los anticuerpos humanizados.

Los anticuerpos humanos mAb dirigidos contra proteínas humanas pueden ser generados utilizando ratones transgénicos que portan el sistema inmunológico humano completo en lugar del sistema de ratón. Los esplenocitos de estos ratones transgénicos inmunizados con el antígeno de interés se usan para producir hibridomas que secretan mAb humanos con afinidades específicas para epítopos de una proteína humana (véase, por ejemplo, Wood et al. Solicitud Internacional WO 91/00906, Kucherlapati et al. PCT publication WO 91/10741; Lonberg et al. Solicitud Internacional WO 92/03918; Kay et al. Solicitud Internacional 92/03917; Lonberg, N. et al. 1994 Nature 368:856-859; Green, L. L. et al. 1994 Nature Genet. 7:13-21; Morrison, S. L. et al. 1994 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855; Bruggeman et al. 1993 Year Immunol 7:33-40; Tuailon et al. 1993 PNAS 90:3720-3724; Bruggeman et al. 1991 Eur J Immunol 21:1323-1326).

Tales ratones transgénicos están disponibles en Abgenix, Inc., Fremont, Calif., y Medarex, Inc., Annandale, N.J. Se ha descrito que la delección homocigota del gen de la región que se une a la cadena del anticuerpo (IH) en ratones mutantes de línea germinal y quiméricos da como resultado la completa inhibición de la producción de anticuerpos endógenos. La transferencia del arreglo génico de inmunoglobulina de línea germinal humano en tales ratones mutantes de línea germinal resultará en la producción de anticuerpos humanos tras la exposición al antígeno. Véase, por ejemplo, Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:2551 (1993); Jakobovits et al., Nature 362:255-258 (1993); Bruggermann et al., Year in Immunol. 7:33 (1993); y Duchosal et al. Nature 355:258 (1992). Los anticuerpos humanos también se pueden obtener de bibliotecas de expresión de fagos s (Hoogenboom et al., J. Mol. Biol. 227: 381 (1991); Marks et al., J. Mol. Biol. 222:581-597 (1991); Vaughan, et al., Nature Biotech 14:309 (1996)).

Los inventores de esta solicitud han planteado anticuerpos contra varias partes del receptor de dominio Vps10ps.

En una realización, se describen anticuerpos contra la característica común de esta familia de receptores - el dominio Vps10p.

**Tabla1: Anticuerpos contra receptores de dominio Vps10p**

| Receptor | Nombre      | Antígeno                           | Especies | Western | IH/IC | Ref.  |
|----------|-------------|------------------------------------|----------|---------|-------|---|
| SorLA    | SORLA cabra | Dominio extracelular               | cabra    | X       | X     | Schmidt et al., J.Biol.Chem. 282:32956-67, 2007 |
|          | Hale SORLA  | Dominio citoplásmico               | conejo   | X       |       |   |
|          | SORLA LA    | Repetición del tipo complementaria | conejo   | X       |       |   |
|          | Sol SORLA   | Dominio extracelular               | conejo   | X       | X     | Andersen et al., PNAS103:13461-6, 2005          |
|          | Cola SORLA  | Dominio citoplásmico               | conejo   | X       |       |   |
|          | SORLA VPS   | Dominio VPS10p                     | conejo   | X       |       |   |

ES 2 464 459 T3

| Receptor  | Nombre                 | Antígeno                                 | Especies | Western | IH/IC | Ref.   |
|-----------|------------------------|--|----------|---------|-------|--|
|           | #606870                | Secuencia peptídica en el dominio Vps10p | conejo   | X       |       |  |
|           | #642739                | C-terminal                               | conejo   | X       |       |  |
|           | #643739                | Cola citoplásmica                        | conejo   | X       |       |  |
|           | 20C11                  | Dominio extracelular                     | ratón    | X       | X     |  |
|           | AG4                    | Dominio extracelular                     | ratón    | X       |       |  |
| Sortilina | #5264                  | Dominio extracelular                     | conejo   | X       | X     | Munck Petersen et al, EMBO J. 18 :595-604, 1999                  |
|           | #5448                  | Dominio citoplásmico                     | conejo   | X       | X     | Jansen et al, Nature Neurosci. 10 :1449 - 1457, 2007             |
|           | #5287                  | Dominio citoplásmico                     | conejo   | X       |       |  |
|           | CP 96 334<br>SR 96 204 | propéptido                               | Conejo   | X       |       | Munck Petersen et al, EMBO J. 18 :595-604, 1999                  |
|           | #5438                  | Vps10p                                   | conejo   | X       |       |  |
|           | Sortilina              | Dominio extracelular                     | cabra    | X       |       |  |
|           | F9                     | Dominio extracelular                     | ratón    | X       | X     |  |
|           | F11                    | Dominio extracelular                     | ratón    | X       | X     |  |
|           | AF2934                 | Dominio extracelular                     | cabra    | X       | X     | R&D Systems, Jansen et al, Nature Neurosci. 10 :1449- 1457, 2007 |
|           | AF3154                 | Dominio extracelular                     | cabra    | X       | X     | R&D Systems; Jansen et al, Nature Neurosci. 10 :1449- 1457, 2007 |
|           | anti-NTR3              | Dominio extracelular                     | ratón    | X       | X     | BD Transduction Laboratories,                                    |
|           | ANT-009                | Dominio extracelular                     | ratón    | X       | X     | Alomone Labs ; Nykjaer et al, Nature 427 :843-848, 2004          |
| SorCS1    | AF3457                 | Dominio extracelular                     | cabra    | X       | X     | BD Transduction Laboratories                                     |
|           | SorCS1 cabra           | Dominio extracelular                     | cabra    | X       |       |  |
|           | L-SorCS1               | Dominio extracelular                     | conejo   | X       | X     | Hermeijer et al, J.Biol.Chem. 279:50221-50229, 2003              |
|           | Leu-SorCS1             | Dominio rico en leucina                  | conejo   | X       | X     | Hermeijer et al, J.Biol.Chem. 279:50221- 50229, 2003             |
|           | #5466                  | Dominio extracelular                     | conejo   | X       | X     |  |
|           | 1 D                    | Dominio extracelular                     | ratón    | X       |       |  |

ES 2 464 459 T3

| Receptor | Nombre          | Antígeno                         | Especies | Western | IH/IC | Ref.  |
|----------|-----------------|----------------------------------|----------|---------|-------|---|
|          | 4H              | Dominio extracelular             | ratón    | X       |       |   |
|          | 6B              | Dominio extracelular             | ratón    | X       |       |   |
|          | 4A              | Dominio extracelular             | ratón    | X       |       |   |
| SorCS2   | AF4237          | Dominio extracelular             | oveja    | X       |       | BD Transduction Laboratories                                    |
|          | SorCS2<br>cabra | Dominio extracelular             | cabra    | X       | X     |   |
|          | #5422           | Dominio extracelular             | conejo   | X       | X     | Hermey et al, Biochem. J., 395:285-93, 2006                     |
|          | #5431           | Aminoácidos del terminal<br>C 28 | conejo   | X       | X     |   |
|          | SorCS2-prp      | propéptido                       | conejo   | X       |       | Schousboe Sjoegaard, Dissertation, Aarhus University, 2005      |
|          | M1              | Dominio extracelular             | ratón    |         | X     | Roland Hoist, Master of Science Thesis, Aarhus University, 2006 |
|          | M3              | Dominio extracelular             | ratón    |         | X     | Roland Hoist, Master of Science Thesis, Aarhus University, 2006 |
|          | M4              | Dominio extracelular             | ratón    |         | X     | Roland Hoist, Master of Science Thesis, Aarhus University, 2006 |
|          | M7              | Dominio extracelular             | ratón    |         | X     | Roland Hoist, Master of Science Thesis, Aarhus University, 2006 |
|          | M9              | Dominio extracelular             | ratón    |         | X     | Roland Hoist, Master of Science Thesis, Aarhus University, 2006 |
|          | M10             | Dominio extracelular             | ratón    |         | X     | Roland Hoist, Master of Science Thesis, Aarhus University, 2006 |
|          | M13             | Dominio extracelular             | ratón    | X       |       | Roland Hoist, Master of Science Thesis, Aarhus University, 2006 |
|          | M15             | Dominio extracelular             | ratón    |         | X     | Roland Hoist, Master of Science Thesis, Aarhus University, 2006 |
|          | M18             | Dominio extracelular             | ratón    | X       | X     | Roland Hoist, Master of Science Thesis, Aarhus University, 2006 |
|          | M19             | Dominio extracelular             | ratón    | X       | X     | Roland Hoist, Master of Science Thesis, Aarhus University, 2006 |
|          | S21             | Dominio extracelular             | ratón    | X       |       | Roland Hoist, Master of Science Thesis, Aarhus University, 2006 |

| Receptor | Nombre             | Antígeno                  | Especies   | Western | IH/IC | Ref.   |
|----------|--------------------|---------------------------|------------|---------|-------|--|
|          | SorCS2-GST-73aa    | Dominio extracelular      | conejo     | X       |       |  |
|          | SorCS2-GST-100aa   | Dominio extracelular      | conejo     | X       |       |  |
|          | SorCS2-GST-172aa   | Dominio extracelular      | conejo     | X       |       |  |
| SorCS3   | SorCS3-N           | Dominio extracelular      | conejo     | X       |       |  |
|          | SorCS3-C           | 15 aminoácidos terminal C | del conejo | X       |       |  |
|          | Sort3 N Term #5389 | Dominio terminal N        | conejo     | X       | X     | Westergaard et al, FEBS Lett. 579:1172-6, 2005 |
|          | #5432              | Dominio extracelular      | conejo     | X       | X     |  |
|          | MAB3067            | Dominio extracelular      | ratón      | X       |       | BD Transduction Laboratories                   |
|          | MAB30671           | Dominio extracelular      | ratón      | X       |       | BD Transduction Laboratories                   |
|          | AF3326             | Dominio extracelular      | cabra      | X       |       | BD Transduction Laboratories                   |
|          | SorCS3 cabra       | Dominio extracelular      | cabra      | X       |       |  |

En una realización, el agente es un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en anticuerpos TrpV1 detallados en la Tabla 2.

**Tabla 2: Anticuerpos contra los receptores TrpV1**

| Receptor | Nombre  | Antígeno             | Especie | Western | IH/IC | Ref.                     |
|----------|---------|----------------------|---------|---------|-------|--------------------------|
| TrpV1    | Ab10296 | Dominio extracelular | Conejo  | X       | X     | Abcam                    |
|          | Ab72142 | Dominio extracelular | Conejo  | X       | X     | Abcam                    |
|          | Ab72173 | Dominio extracelular | Conejo  | X       | X     | Abcam                    |
|          | Ab3487  | Dominio extracelular | Conejo  | X       | X     | Abcam                    |
|          | AF3066  | Dominio extracelular | Cabra   | X       | X     | R&D Systems              |
|          | Sc20813 | Dominio extracelular | Conejo  | X       | X     | Santa Cruz Biotechnology |
|          | Sc12400 | Dominio extracelular | Cabra   | X       | X     | Santa Cruz Biotechnology |
|          | Sc12498 | Dominio extracelular | Cabra   | X       | X     | Santa Cruz Biotechnology |
|          | Sc28759 | Dominio extracelular | conejo  | X       | X     | Santa Cruz Biotechnology |

En otra realización, el agente es un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en anticuerpos TrkA detallados en la tabla 3.

Tabla 3: Anticuerpos contra TrkA

| Receptor | Nombre  | Antígeno             | Especie | Western | IH/IC | Ref.                   |
|----------|---------|----------------------|---------|---------|-------|------------------------|
| TrkA     | 250893  | Dominio extracelular | Conejo  | X       | X     | ABBIOTEC               |
|          | Ab43416 | Dominio extracelular | Ratón   | X       | X     | Abcam                  |
|          | Ab72122 | Dominio extracelular | Conejo  | X       | X     | Abcam                  |
|          | Ab8871  | Dominio extracelular | Conejo  | X       | X     | Abcam                  |
|          | Ab36961 | Dominio extracelular | Conejo  | X       | X     | Abcam                  |
|          | Ab72162 | Dominio extracelular | Conejo  | X       | X     | Abcam                  |
|          | AB72160 | Dominio extracelular | conejo  | X       | X     | Abcam                  |
|          | Sc20539 | Dominio extracelular | Cabra   | X       | X     | Santa Biotechnoly Cruz |
|          | Sc14024 | Dominio extracelular | Conejo  | X       | X     | Santa Biotechnoly Cruz |
|          | Sc80961 | Dominio extracelular | Ratón   | X       | X     | Santa Biotechnoly Cruz |
|          | Sc20537 | Dominio extracelular | cabra   | X       | X     | Santa Biotechnoly Cruz |
|          | Sc80398 | Dominio extracelular | ratón   | X       | X     | Santa Biotechnoly Cruz |
|          | Sc80399 | Dominio extracelular | ratón   | X       | X     | Santa Biotechnoly Cruz |
|          | MAB175  | Dominio extracelular | Ratón   | X       | X     | R&D systems            |
|          | AF175   | Dominio extracelular | cabra   | X       | X     | R&D systems            |
|          | MAB1751 | Dominio extracelular | Ratón   | X       | X     | R&D systems            |
|          | AF1056  | Dominio extracelular | Cabra   | X       | X     | R&D systems            |
|          | BAF1056 | Dominio extracelular | Cabra   | X       | X     | R&D systems            |
|          | MAB1056 | Dominio extracelular | ratón   | X       | X     | R&D systems            |

*Uso genérico de un anticuerpo para inhibir la unión de un ligando*

- 5 Un anticuerpo se une fuertemente a una molécula diana particular, de este modo, ya sea inactivando la misma directamente o marcan la misma para su destrucción. El anticuerpo reconoce su objetivo (antígeno) con una notable especificidad y fuerza dictada por la suma de muchas fuerzas químicas, incluyendo enlaces de hidrógeno, y fuerzas de van der Waals e hidrofóbicas, así como interacciones iónicas. En general, cuanto más complejo sea el objetivo químicamente, más inmunogénico será el mismo. El determinante antigénico puede abarcar tramos de aminoácidos lineales cortos o un módulo de proteína en tres dimensiones más complicado.

Procedimientos para preparar anticuerpos

- 10 Los anticuerpos monoclonales y policlonales dirigidos contra un antígeno específico, o epítipo de un antígeno, se pueden producir de acuerdo a procedimientos estándar (véase por ejemplo, anticuerpos - Antibodies - A laboratory Manual by Ed Harlow y David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory 1998, ISBN 0-87969-314-2). El procedimiento para la posterior generación de anticuerpos humanizados o fragmentos del mismo también se ha descrito (por

ejemplo A. M. Scott et al, Cancer Research 60:3254-3261, 2000; A. Nissim y Y. Chernajovsky, Handb. Exp. Pharmacol. 181:3-18, 2008; A. Mountain y J. R. Adair, Biotechnol. Genet. Eng. Rev. 10:1-142, 1992).

#### *Expectativas generales de éxito en la fabricación de anticuerpos*

5 Es posible generar anticuerpos contra cualquier motivo de péptido o polipéptido de los receptores que forman el complejo de señalización de dolor que la presente invención establece para inhibir. Los anticuerpos se pueden generar utilizando oligopéptidos sintéticos cortos que abarcan el epítipo objetivo deseado. Por lo tanto, se garantiza que se pueden generar los anticuerpos contra estos sitios de unión de ligando sobre los receptores. El hecho de que las especies de anticuerpos individuales tienen el potencial de inhibir la unión al ligando o no, simplemente depende del hecho de que la afinidad de la inmunoglobulina para el receptor exceda aquella del ligando. Al final, es una cuestión de detección del potencial inhibidor de una serie de anticuerpos individuales para encontrar uno con las propiedades deseadas.

15 Los ensayos de detección de anticuerpos inhibidores son de conocimiento común y normalmente implican un ensayo inmunosorbente ligado a la enzima c (ELISA). En detalle, el receptor o un fragmento recombinante que abarca su motivo de unión a ligando se inmoviliza en pocillos duplicados de placas de microtitulación. Posteriormente, los pocillos se incuban con una solución que contiene el ligando. La unión del ligando al receptor inmovilizado se confirma utilizando un anticuerpo que reconoce el ligando y que es acoplado con una reacción de color de tinte. La unión del ligando al receptor se prueba en presencia de diversos anticuerpos para identificar las especies de inmunoglobulina que bloquean la unión del ligando al receptor y por lo tanto prevenir la reacción de color en la respectiva placa de microtitulación.

#### *Uso clínico exitoso de anticuerpos*

20 Un número de anticuerpos terapéuticos están en uso clínico. Los ejemplos incluyen Rituxan de Genentech, un anticuerpo dirigido contra el receptor CD20 (utilizado en la artritis reumatoide), Johnson & Johnson Remicade, un anticuerpo dirigido contra el receptor de TNF alfa (en la psoriasis), Avastin de Roche, un anticuerpo anti-VEGF utilizado para el tratamiento de cáncer colorrectal y cáncer de pulmón, así como Herceptin, un anticuerpo contra el receptor de HRE2 usado en la terapia del cáncer de mama.

30 La evaluación de la unión a un receptor es trabajo de rutina para la persona experta en el campo técnico. A este respecto, tiene que ser mencionado que las pro- neurotrofinas, así como la familia de receptores de dominio Vps10p se conocían en la fecha de prioridad de esta invención y los ensayos de unión que implican por ejemplo pro-neurotrofinas se ha mencionado en la técnica anterior, por ejemplo en el artículo de Lee et al (2001 ), Science 294:1945-1948 .

Por consiguiente, en una realización de la presente invención al menos un agente es un anticuerpo que está dirigido contra una parte extracelular de un receptor de dominio Vps10p.

En otra realización el agente es un anticuerpo dirigido contra una parte intracelular del receptor de dominio Vps10p.

En aún otra realización de la presente invención el anticuerpo está dirigido contra el receptor Trpv.

35 En otra realización de la presente invención el anticuerpo está dirigido contra el receptor TrkA .

En realización una de la presente invención dicho anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en: anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, anticuerpos humanizados, anticuerpos de cadena simple anticuerpos recombinantes.

40 En una realización la presente invención se refiere a un inmunoconjugado que comprende el anticuerpo como se define en la presente memoria más arriba y un conjugado seleccionado del grupo que consiste en: un agente citotóxico tal como un agente quimioterapéutico, una toxina, o un isótopo radioactivo; un miembro de un par de unión específica, tal como avidina o estreptavidina o un antígeno.

#### **Procedimientos de detección de agentes/antagonistas/inhibidores del complejo del receptor de dominio VPs10p : receptor Trpv**

45 La presente invención proporciona procedimientos para detectar y evaluar agentes candidatos capaces de unirse a una entidad del complejo binario del receptor de dominio Vps10p : receptor Trpv, y/o complejo ternario del receptor de dominio Vps10p : TrkA : receptor Trpv inhibiendo de ese modo la formación de dicho complejo.

50 Si bien la detección de un gran número de péptidos para una cierta actividad fisiológica puede ser una tarea laboriosa, las descripciones exactas del ensayo en la presente memoria que deben llevarse a cabo permiten a la persona experta reproducir la presente invención sin carga indebida de experimentación y sin necesidad de habilidad inventiva.

Con este fin las bibliotecas de detección de agentes candidatos están disponibles para su compra en el mercado. Si una biblioteca es una biblioteca de péptidos o una biblioteca química no tiene ningún impacto en la situación actual

ya que la detección de bibliotecas químicas es también el trabajo de rutina. De hecho la detección de bibliotecas químicas es un servicio ofrecido por las empresas comerciales, y se desprende de su material de presentación (Véase, por ejemplo <http://www.analyticon.com/>) que no tienen en cuenta el trabajo de detección como inventivo.

5 En un aspecto la presente invención se refiere a un procedimiento in vitro para detectar el agente como se define en la presente memoria más arriba, donde dicho procedimiento comprende las etapas de:

- i. proporcionar un receptor de dominio Vps10p y un receptor Trpv, o
- ii. proporcionar un receptor de dominio Vps10p y un receptor Trpv y un receptor TrkA, y
- iii. proporcionar una biblioteca de agentes potenciales, y
- 10 iv. proporcionar un ensayo para medir la unión de una primera entidad receptor de dominio Vps10p a una segunda entidad receptor Trpv, o
- v. proporcionar un ensayo para medir la unión de una primera entidad receptor Trpv a una segunda entidad receptor de dominio Vps10p, o
- 15 vi. proporcionar un ensayo para medir la unión de una primera entidad receptor Trpv a una segunda entidad (receptor de dominio Vps10p : receptor TrkA) complejo binario, o
- vii. proporcionar un ensayo para medir la unión de una primera entidad complejo binario (receptor de dominio Vps10p : receptor TrkA) a una segunda entidad receptor Trpv, o
- viii. proporcionar un ensayo para medir la unión de una primera entidad receptor de dominio Vps10p a una segunda entidad complejo binario (TrpV : receptor TrkA), o
- 20 ix. proporcionar un ensayo para medir la unión de una primera entidad complejo binario (TrpV : receptor TrkA) a una segunda entidad receptor de dominio Vps10p, o
- x. proporcionar un ensayo para medir la unión de una primera entidad receptor TrkA a una segunda entidad complejo binario (TrpV : receptor de dominio Vps10p), o
- 25 xi. proporcionar un ensayo para medir la unión de una primera entidad complejo binario (TrpV : receptor de dominio Vps10p) a una segunda entidad receptor TrkA, y
- xii. añadir la biblioteca de agentes potenciales que deben ser ensayados al ensayo seleccionado de iv a xi, y
- xiii. determinar la cantidad de dicha primera entidad respecto de dicha segunda entidad, y
- xiv. comparar la cantidad determinada en la etapa xiv) con una cantidad medida en ausencia del agente que debe ser ensayado,
- 30 xv. en el que la diferencia en las dos cantidades identifica un agente que altera la unión de la primera entidad a la segunda entidad.

35 También se divulga un procedimiento para determinar el grado de inhibición de un agente de la invención, sobre la actividad de un receptor de dominio Vps10p en un cultivo celular que expresa dicho receptor, en el que dicho receptor de dominio Vps10p comprende una secuencia de aminoácidos que tienen al menos 60% de identidad de secuencia respecto de SEC ID NO. 1, SEC ID NO. 2, SEC ID NO. 3, SEC ID NO. 4 o SEC ID NO. 5, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:

- a. proporcionar un cultivo celular que expresa un receptor de dominio Vps10p, y
- b. proporcionar un agonista del receptor de dominio Vps10p, y
- c. proporcionar una biblioteca de agentes potenciales, y
- 40 d. proporcionar un ensayo para la determinación de la unión a, internalización de y señalización a través de, un receptor de dominio Vps10p, comprendiendo dicho ensayo
- e. añadir la biblioteca de agentes potenciales que deben ser ensayados c) al cultivo celular a), en presencia del agonista b), y
- f. determinar
  - i. la cantidad de agente unido al receptor de dominio Vps10p, y/o
  - 45 ii. la cantidad de agente internalizado por el receptor de dominio Vps10p, y/o

iii. el grado de señalización a través del receptor de dominio Vps10p, y

g. comparar la cantidad determinada en la etapa f) con una cantidad medida en ausencia de los agentes que deben ser ensayados,

h. en el que la diferencia en las dos cantidades identifica un agente

- 5
- i. capaz de la unión a un receptor de dominio Vps10p, y/o
  - ii. capaz de inhibir la señalización a través de un receptor de dominio Vps10p, y/o
  - iii. capaz de inhibir la internalización de un agonista de dicho receptor de dominio Vps10p

También se divulga un procedimiento para determinar el grado de inhibición de un agente de la presente invención como se define en la presente memoria más arriba, sobre la actividad de un receptor Trpv en un cultivo celular que expresa dicho receptor, en el que dicho receptor Trpv comprende una secuencia de aminoácidos que tienen al menos 70% de identidad de secuencia respecto de SEC ID NO. 6, SEC ID NO. 7, SEC ID NO. 8 o SEC ID NO. 9, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:

- 10
- a. proporcionar un cultivo celular que expresa un receptor Trpv, y
  - b. proporcionar un agonista del receptor Trpv, y
  - 15 c. proporcionar una biblioteca de agentes potenciales, y
  - d. proporcionar un ensayo para la determinación de la unión a un receptor Trpv, comprendiendo dicho ensayo
  - e. añadir la biblioteca de agentes potenciales que deben ser ensayados c) al cultivo celular a), en presencia del agonista b), y
  - f. determinar la cantidad de agente unido al receptor Trpv y
  - 20 g. comparar la cantidad determinada en la etapa f) con una cantidad medida en ausencia del agente que debe ser ensayado,
  - h. en el que la diferencia en las dos cantidades identifica un agente capaz de unirse a un receptor Trpv.

También se divulga un procedimiento para determinar el grado de inhibición de un agente como se define en la presente memoria más arriba sobre la actividad de un receptor TrkA en un cultivo celular que expresa dicho receptor, en el que dicho receptor TrkA comprende una secuencia de aminoácidos que tienen al menos 70% de identidad de secuencia respecto de SEC ID NO. 10, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:

- 25
- a. proporcionar un cultivo celular que expresa un receptor TrkA, y
  - b. proporcionar un agonista del receptor TrkA, y
  - c. proporcionar una biblioteca de agentes potenciales, y
  - 30 d. proporcionar un ensayo para la determinación de la unión a un receptor TrkA, comprendiendo dicho ensayo
  - e. añadir la biblioteca de agentes potenciales que deben ser ensayados c) al cultivo celular a), en presencia del agonista b), y
  - f. determinar la cantidad de agente unido al receptor TrkA y
  - 35 g. comparar la cantidad determinada en la etapa f) con una cantidad medida en ausencia del agente que debe ser ensayado, en el que la diferencia en las dos cantidades identifica un agente capaz de unirse a un receptor TrkA.

También se divulga un procedimiento para determinar el grado de inhibición de un agente como se define en la presente memoria más arriba sobre la actividad de un receptor de dominio Vps10p en un cultivo celular que expresa dicho receptor y con un cultivo celular que carece de la expresión de dicho receptor, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:

- 40
- a. proporcionar un cultivo celular que expresa un receptor de dominio Vps10p, y
  - b. proporcionar un cultivo celular que no expresa un receptor de dominio Vps10p, y
  - c. opcionalmente proporcionar un cultivo celular que sobreexpresa un receptor de dominio Vps10p
  - d. proporcionar un agonista para la sensación de dolor del receptor de dominio Vps10p, y

- e. proporcionar una biblioteca de agentes potenciales, y
- f. proporcionar un primer ensayo que comprende a) y un segundo ensayo que comprende b) y opcionalmente un tercer ensayo que comprende c), y
- g. añadir la biblioteca de agentes potenciales que deben ser ensayados a los tres ensayos, y
- 5 h. determinar
  - i. la cantidad de agente unido al receptor de dominio Vps10p, y/o
  - ii. la cantidad de agente internalizado por el receptor de dominio Vps10p, y/o
  - iii. el grado de señalización a través del receptor de dominio Vps10p, y
- 10 i. comparar la cantidad de agente determinada en la etapa g) utilizando a) con la cantidad determinada en g) utilizando b) y la cantidad determinada en g) utilizando c),
- j. en el que la diferencia en las cantidades identifica un agente capaz de
  - i. unirse a un receptor de dominio Vps10p, y/o
  - ii. inhibir la señalización a través de un receptor de dominio Vps10p, y/o
  - iii. inhibir la internalización de un agonista de dicho receptor de dominio Vps10p.
- 15 También se divulga un procedimiento para determinar el grado de inhibición de un agente como se define en la presente memoria más arriba sobre la actividad de un receptor Trpv en un cultivo celular que expresa dicho receptor y con un cultivo celular que carece de la expresión de dicho receptor, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:
  - a. proporcionar un cultivo celular que expresa un receptor Trpv, y
  - 20 b. proporcionar un cultivo celular que no expresa un receptor Trpv, y
  - c. opcionalmente proporcionar un cultivo celular que sobreexpresa a trpV receptor
  - d. proporcionar un agonista del receptor Trpv, y
  - e. proporcionar una biblioteca de agentes potenciales, y
  - f. proporcionar un primer ensayo que comprende a) y un segundo ensayo que comprende b) y opcionalmente un
  - 25 tercer ensayo que comprende c), y
  - g) añadir la biblioteca de agentes potenciales que deben ser ensayados a los tres ensayos, y determinar
    - i. la cantidad de agente unido al receptor Trpv, y/o
    - ii. el grado de señalización a través del receptor Trpv, y
  - h. comparar la cantidad de agente determinada en la etapa h) utilizando a) con la cantidad determinada en h) utilizando b) y la cantidad determinada en g) utilizando c),
  - 30 i. en el que la diferencia en las cantidades identifica un agente capaz de unirse a un receptor Trpv, y/o inhibir la señalización a través de TrpV.
- También se divulga un procedimiento para determinar el grado de inhibición de un agente como se define en la presente memoria más arriba sobre la actividad de un receptor TrkA en un cultivo celular que expresa dicho receptor y con un cultivo celular que carece de la expresión de dicho receptor, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:
  - a. proporcionar un cultivo celular que expresa un receptor TrkA, y
  - b. proporcionar un cultivo celular que no expresa un receptor TrkA, y
  - c. opcionalmente proporcionar un cultivo celular que sobreexpresa un receptor TrkA
  - 40 d. proporcionar un agonista del receptor TrkA, y
  - e. proporcionar una biblioteca de agentes potenciales, y

f. proporcionar un primer ensayo que comprende a) y un segundo ensayo que comprende b) y opcionalmente un tercer ensayo que comprende c), y

g. añadir la biblioteca de agentes potenciales que deben ser ensayados a los tres ensayos, y

h. determinar

- 5
- i. la cantidad de agente unido al receptor TrkA, y/o
  - ii. la cantidad de agente internalizado por el receptor TrkA, y/o
  - iii. el grado de señalización a través del receptor TrkA, y

i. comparar la cantidad de agente determinada en la etapa h) utilizando a) con la cantidad determinada en h) utilizando b) y la cantidad determinada en g) utilizando c),

- 10
- j. en el que la diferencia en las cantidades identifica un agente capaz de unirse a un receptor TrkA, y/o inhibir la señalización a través de TrkA.

También se divulga un procedimiento para determinar el grado de inhibición de un agente como se define en la presente memoria más arriba sobre la actividad de un receptor de dominio Vps10p en un mamífero que expresa dicho receptor con un segundo mamífero que carece de la expresión de dicho receptor y un tercer mamífero que sobreexpresa dicho receptor, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:

- 15
- a. proporcionar a un mamífero que expresa un receptor de dominio Vps10p, y
  - b. proporcionar a un mamífero que no expresa un receptor de dominio Vps10p, y
  - c. proporcionar a un mamífero que sobreexpresa un receptor de dominio Vps10p, y
- proporcionar un agonista para la sensación de dolor del receptor de dominio Vps10p, y
- 20
- d. proporcionar una biblioteca de agentes potenciales, y
  - e. administrar dicha biblioteca de agentes a dicho mamífero de a), b) y c) respectivamente, y
  - f. determinar el grado de señalización de dolor a través del receptor de dominio Vps10p, en cada uno de los mamíferos definidos en a), b) y c), utilizando
    - i. ensayo de von Frey y/o
    - 25 ii. ensayo de inmersión de cola y/o
    - iii. ensayo de placa caliente, y
  - h. comparar el grado de señalización de dolor en la etapa g) utilizando a) con el grado determinado en g) utilizando b) con el grado determinado en g) utilizando c),

- 30
- en el que la diferencia en el grado de inhibición identifica un agente capaz de unirse a un receptor de dominio Vps10p, inhibiendo la señalización a través de un receptor de dominio Vps10p.

También se divulga un procedimiento para determinar el grado de inhibición de un agente como se define en la presente memoria más arriba sobre la actividad de un receptor Trpv en un mamífero que expresa dicho receptor con un segundo mamífero que carece de la expresión de dicho receptor y un tercer mamífero que sobreexpresa dicho receptor, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:

- 35
- a. proporcionar a un mamífero que expresa un receptor Trpv, y
  - b. proporcionar a un mamífero que no expresa un receptor Trpv, y
  - c. proporcionar a un mamífero que sobreexpresa un receptor Trpv, y
  - d. proporcionar un agonista para la sensación de dolor of el receptor Trpv, y
  - e. proporcionar una biblioteca de agentes potenciales, y
  - 40 f. administrar dicho biblioteca de agentes a dicho mamífero de a), b) y c) respectivamente, y
  - g. determinar el grado de dolor señalización a través del receptor Trpv, en cada uno de los mamíferos definidos en a), b) y c), utilizando ensayo de von Frey y/o Ensayo de inmersión de cola y/o Ensayo de placa caliente, y

h. comparar el grado de señalización de dolor en la etapa g) utilizando a) con el grado determinado en g) utilizando b) con el grado determinado en g) utilizando c),

en el que la diferencia en el grado de inhibición identifica un agente capaz de unirse a un receptor Trpv e inhibir la señalización a través de dicho receptor Trpv.

5 En otro aspecto la presente invención se refiere a un procedimiento para determinar el grado de inhibición de un agente como se define en la presente memoria más arriba, sobre la actividad de un complejo binario de receptor de dominio Vps10p : receptor Trpv en un mamífero que expresa dichos receptores con un segundo mamífero que carece de la expresión de dichos receptores y un tercer mamífero que sobreexpresa dichos receptores, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:

10 a. proporcionar a un primer y un segundo mamífero que expresan tanto un receptor Trpv y un receptor de dominio Vps10p, y

b. proporcionar a un primer y un segundo mamífero que carecen de la expresión de un receptor Trpv y un receptor de dominio Vps10p, y

15 c. proporcionar a un primer y un segundo mamífero que sobreexpresan un receptor Trpv y un receptor de dominio Vps10p, y

d. proporcionar un agonista para la sensación de dolor del receptor Trpv y/o receptor de dominio Vps10p, y

e. proporcionar una biblioteca de agentes potenciales capaces de inhibir la señalización a través de un complejo binario del receptor de dominio Vps10p : receptor Trpv, y

f. administrar dicha biblioteca de agentes a dicho primer mamífero de a), b) y c) respectivamente, y

20 g. administrar placebo a dicho segundo mamífero de a), b), y c), y

h. determinar el grado de señalización de dolor a través del receptor Trpv, en cada uno del primer y segundo mamíferos definidos en a), b) y c),

utilizando

i. ensayo de von Frey y/o

25 ii. ensayo de inmersión de cola y/o

iii. ensayo de placa caliente, y

i. comparar el grado de señalización de dolor en el primer y segundo mamíferos de la etapa h) utilizando a) y

j. comparar el grado de señalización de dolor en el primer y segundo mamíferos de h) utilizando b) y

k. comparar el grado de señalización de dolor en el primer y segundo mamíferos de h) utilizando c),

30 en el que la diferencia en el grado de inhibición de señalización de dolor identifica un agente capaz de unirse a un complejo de receptor de dominio Vps10p: receptor Trpv y inhibiendo la señalización a través de dicho complejo.

En otra realización el agonista de la sensación de dolor como se describe en los procedimientos de detección en la presente memoria más arriba, es un receptor TrkA (SEC ID NO. 10) o un fragmento o variante del mismo.

35 En aún otra realización el agonista de la sensación de dolor como se describe en los procedimientos de detección en la presente memoria más arriba es una neurotrofina seleccionada del grupo que consiste en NGF, BDNF, NT3 y NT4/5 o un fragmento o variante del mismo.

#### **Ratón knock-out SorCS1-2**

40 También se describe un ratón transgénico knock-out en el que los genes endógenos del receptor de dominio Vps10p SorCS1 y/o SorCS2 se han interrumpido para abolir la expresión de un receptor funcional, y en el que dicho ratón exhibe una respuesta reducida a los estímulos de dolor en relación con un ratón de control no transgénico.

En otra realización la interrupción génica del ratón transgénico como se define en la presente memoria más arriba comprende una delección de las secuencias de nucleótidos del gen del receptor SorCS1 que codifican el codón de iniciación o una región del receptor SorCS1 de ratón desde el dominio extracelular, dominio transmembrana, o el dominio citoplásmico.

45 También se describe un procedimiento para detectar un agente candidato para la habilidad de reducir el dolor en el ratón transgénico como se define en la presente memoria más arriba que comprende:

a. proporcionar a primer y un segundo ratón transgénico SorCS1 y/o SorCS2 como se define en la presente memoria más arriba;

b. administrar a dicho primer ratón transgénico un agente candidato, y

5 c. comparar el comportamiento de dolor de dicho primer ratón transgénico de la etapa (b) con el comportamiento de dolor de dicho segundo ratón transgénico de la etapa (a) al que no se administró dicho agente candidato; en el que una reducción en el comportamiento de dolor en dicho primer ratón transgénico al que se administró dicho agente candidato respecto de dicho segundo ratón transgénico al que no se le administró dicho agente candidato indica que el agente candidato reduce el comportamiento de dolor.

10 También se describe un procedimiento para detectar un agente candidato por la capacidad de reducir el dolor en un ratón transgénico SorCS1-2 como se define en la presente memoria más arriba que comprende las etapas de :

a. proporcionar el ratón SorCS1-2 como se define en la presente memoria más arriba;

b. proporcionar el ratón de tipo salvaje que carece del la interrupción génica en SorCS1-2 como se define en la presente memoria más arriba; y

15 c. proporcionar un ratón de tipo salvaje de control que carece de la interrupción génica en SorCS1-2 como se define en la presente memoria más arriba; y

d. administrar a dicho primer ratón de tipo salvaje (b) un agente candidato, y

20 e. comparar el comportamiento de dolor de dicho ratón transgénico de la etapa (a) con el comportamiento de dolor de dicho ratón de tipo salvaje de la etapa (b) al que se le administró dicho agente candidato con el comportamiento de dolor de dicho control ratón de tipo salvaje de la etapa (c) al que no se le administró dicho agente candidato; en el que una reducción en el comportamiento de dolor en dicho ratón de tipo salvaje (b) al que se le administró dicho agente candidato hasta un nivel comparable con dicho segundo ratón transgénico al que no se le administró dicho agente candidato relativamente respecto del ratón de tipo salvaje de control (c) indica que el agente candidato reduce el comportamiento del dolor.

#### **Ratón que sobreexpresa Sortilina o SorCS1 o SorCS2**

25 También se describe un a ratón transgénico para la sobreexpresión condicional o obligada de Sortilina o SorCS1 o SorCS2 en tejidos neuronales.

30 En una realización el ratón transgénico para la sobreexpresión condicional o obligada de Sortilina o SorCS1 o SorCS2 en tejidos neuronales como se define en la presente memoria más arriba, con relación a una camada no transgénica, exhibe protección de los estímulos del dolor según lo determinado por un procedimiento seleccionado del grupo que consiste en Ensayo de placa caliente, Ensayo de inmersión de cola y ensayo de von Frey.

#### **Composición farmacéutica y formas de administración**

35 Las principales vías de administración de fármacos, en el procedimiento de tratamiento son la intravenosa, oral, y tópica. También se contemplan otros procedimientos de administración de fármacos, tal como inyección subcutánea o por medio de inhalación, que son eficaces para administrar el fármaco a un sitio diana o para introducir el fármaco en el torrente sanguíneo,.

La membrana de la mucosa a la que se administra la preparación farmacéutica de la invención puede ser cualquier membrana de la mucosa del mamífero a la que la sustancia biológicamente activa debe ser dada, por ejemplo, en la nariz, vagina, ojos, boca, tracto genital, pulmones, tracto gastrointestinal o recto, preferentemente la mucosa de la nariz, boca o vagina.

40 Los compuestos se pueden administrar parenteralmente, es decir, por administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, intranasal, intrarrectal, intravaginal o intraperitoneal. Las formas de la administración parenteral intramusculares y subcutáneas son generalmente preferentes. Las formas de dosificación apropiadas para tal administración se pueden preparar mediante técnicas convencionales. Los compuestos también se pueden administrar por inhalación, que es por administración intranasal e inhalación oral. Las formas de dosificación apropiadas para tal administración, tal como una formulación en aerosol o un inhalador de dosis medida, se pueden preparar mediante técnicas convencionales

45 Los compuestos se pueden administrar con al menos otro compuesto. Los compuestos se pueden administrar simultáneamente, ya sea como formulaciones separadas o combinadas en una forma de dosificación unitaria, o se pueden administrar secuencialmente.

50 Formulaciones

Si bien es posible que los compuestos o sales sean administrados como producto químico en bruto, es preferible

presentarlos en forma de una formulación farmacéutica. Por consiguiente, también se describe la formulación farmacéutica, para aplicación medicinal, que comprende un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, como se define en la presente memoria, y un vehículo farmacéuticamente aceptable para ello.

5 Los compuestos se pueden formular en una amplia variedad de formas de dosificación de administración oral. Las composiciones farmacéuticas y formas de dosificación pueden comprender los compuestos o su sal farmacéuticamente aceptable o una forma cristalina del mismo como el componente activo. Los vehículos farmacéuticamente aceptables pueden ser sólidos o líquidos. Las preparaciones en forma sólida incluyen polvos, comprimidos, píldoras, cápsulas, sellos, supositorios, y gránulos dispersables. Un vehículo sólido puede ser una o más sustancias que pueden actuar también como diluyentes, agentes aromatizantes, solubilizantes, lubricantes, agentes de suspensión, aglutinantes, conservantes, agentes humectantes, agentes disgregantes de comprimidos, o un material encapsulante.

10 Preferentemente, la composición será de aproximadamente 0,5% a 75% en peso de un compuesto o compuestos de la invención, consistiendo el resto en excipientes farmacéuticos adecuados. Para la administración oral, tales excipientes incluyen grados farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, talco, celulosa, glucosa, gelatina, sacarosa, carbonato de magnesio, y similares.

15 En los polvos, el vehículo es un sólido finamente dividido que es una mezcla con el componente activo finamente dividido. En los comprimidos, el componente activo se mezcla con el vehículo que tiene la capacidad de unión necesaria en proporciones adecuadas y se compacta en la forma y tamaño deseados. Los polvos y comprimidos preferentemente contienen de uno a aproximadamente el setenta por ciento del compuesto activo. Los vehículos adecuados son carbonato de magnesio, estearato de magnesio, talco, azúcar, lactosa, pectina, dextrina, almidón, gelatina, tragacanto, metilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica, una cera de bajo punto de fusión, manteca de cacao, y similares. El término "preparación" pretende incluir la formulación del compuesto activo con material de encapsulación como vehículo proporcionando una cápsula en la que el componente activo, con o sin vehículos, está rodeado por un vehículo, que está en asociación con el mismo. De manera similar, se incluyen sellos y pastillas. Los comprimidos, polvos, cápsulas, píldoras, sellos y pastillas pueden ser formas sólidas adecuadas para administración oral.

20 Las gotas pueden comprender soluciones o suspensiones acuosas o en aceite no estériles o estériles, y pueden prepararse disolviendo el ingrediente activo en una solución acuosa adecuada, incluyendo opcionalmente un agente bactericida y/o fungicida y/o cualquier otro conservante adecuado, y opcionalmente incluyendo un agente activo superficial. La solución resultante puede ser luego clarificada por filtración, transferida a un recipiente adecuado que después se sella y se esteriliza mediante autoclave o manteniéndolo a 98-100 ° C durante media hora. Alternativamente, la solución puede esterilizarse por filtración y transferirse al recipiente asépticamente. Los ejemplos de agentes fungicidas y bactericidas adecuados para la inclusión en las gotas son nitrato o acetato fenilmercúrico (0,002%), cloruro de benzalconio (0,01%) y acetato de clorhexidina (0,01%). Los disolventes adecuados para la preparación de una solución oleosa incluyen glicerol, alcohol diluido y propilenglicol.

25 También se incluyen preparaciones en forma sólida que están destinadas a ser convertidas, poco antes del uso, en preparaciones en forma líquida para la administración oral. Tales formas líquidas incluyen soluciones, suspensiones, y emulsiones. Estas preparaciones pueden contener, además del componente activo, colorantes, sabores, estabilizantes, tampones, edulcorantes naturales y artificiales, dispersantes, espesantes, agentes solubilizantes, y similares.

30 Otras formas adecuadas para la administración oral incluyen preparaciones de forma líquida que incluyen emulsiones, jarabes, elixires, soluciones acuosas, suspensiones acuosas, pasta de dientes, dentífrico de gel, goma de mascar, o preparaciones en forma sólida que están destinadas a ser convertidas poco antes del uso en preparaciones en forma líquida. Las emulsiones pueden prepararse en soluciones acuosas de propilenglicol o pueden contener agentes emulsionantes tal como lecitina, monooleato de sorbitán, o acacia. Las soluciones acuosas pueden prepararse disolviendo el componente activo en agua y añadiendo colorantes adecuados, aromatizantes, estabilizantes y agentes espesantes. Las suspensiones acuosas pueden prepararse dispersando el componente activo finamente dividido en agua con material viscoso, gomas naturales o sintéticas tal como, resinas, metilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio, y otros agentes de suspensión bien conocidos. Las preparaciones en forma sólida incluyen soluciones, suspensiones y emulsiones, y pueden contener, además del componente activo, colorantes, sabores, estabilizantes, tampones, edulcorantes naturales y artificiales, dispersantes, espesantes, agentes solubilizantes, y similares

35 Los compuestos pueden formularse para administración parenteral (por ejemplo, por inyección, por ejemplo inyección de bolo o infusión continua) y pueden presentarse en forma de dosis unitaria en ampollas, jeringas precargadas, infusión de pequeño volumen o en recipientes de dosis múltiples con un conservante añadido. Las composiciones pueden tomar formas tales como suspensiones, soluciones, o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, soluciones pro ejemplo en polietilenglicol acuoso. Los ejemplos de vehículos aceitosos o no acuosos, diluyentes, disolventes o vehículos incluyen propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales (por ejemplo, aceite de oliva), y ésteres orgánicos inyectables (por ejemplo, oleato de etilo), y pueden contener agentes de formulación tal como conservantes, humectantes, agentes emulsionantes o de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes.

Alternativamente, el ingrediente activo puede estar en forma de polvo, obtenido por aislamiento aséptico de sólido estéril o por liofilización a partir de solución para la constitución antes del uso con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua estéril libre de pirógenos.

5 Los aceites útiles en formulaciones parenterales incluyen aceites de petróleo, animal, vegetal, o aceites sintéticos. Los ejemplos específicos de aceites útiles en dichas formulaciones incluyen cacahuete, soja, sésamo, semilla de algodón, maíz, oliva, vaselina, y mineral. Los ácidos grasos adecuados para su uso en formulaciones parenterales incluyen ácido oleico, ácido esteárico, y ácido isoesteárico. El oleato de etilo y miristato de isopropilo son ejemplos de ésteres de ácidos grasos adecuados.

10 Los jabones apropiados para su uso en formulaciones parenterales incluyen metal alcalino graso, amonio, y sales de trietanolamina, y los detergentes adecuados incluyen (a) detergentes catiónicos tal como, por ejemplo, haluros de dimetil dialquil amonio, haluros de alquil piridinio; (b) detergentes aniónicos tal como, por ejemplo, alquilo, arilo, y sulfonatos de olefina, alquilo, olefina, éter, sulfatos de monoglicéridos y sulfosuccinatos, (c) detergentes no iónicos tal como, por ejemplo, óxidos de aminas grasas, alcanolamidas de ácidos grasos, y copolímeros de polioxietileno-polipropileno, (d) detergentes anfotericos tal como, por ejemplo, alquil-beta-aminopropionatos, sales de 2-alquilimidazolina amonio cuaternario, y (e) mezclas de los mismos.

15 Las formulaciones parenterales contendrán típicamente desde aproximadamente 0,5 a aproximadamente 25 % en peso del ingrediente activo en solución. Pueden ser utilizados conservantes y tampones. Con el fin de minimizar o eliminar la irritación en el sitio de la inyección, tales composiciones pueden contener uno o más tensioactivos no iónicos que tienen un balance hidrófilo-lipófilo (HLB) de aproximadamente 12 a aproximadamente 17. La cantidad de tensioactivo en tales formulaciones variará típicamente de aproximadamente 5% a aproximadamente 15 % en peso. Los tensioactivos adecuados incluyen ésteres de ácidos grasos de polietilén sorbitán, tal como monooleato de sorbitán y aductos de alto peso molecular de óxido de etileno con una base hidrofóbica, formados por la condensación de óxido de propileno con propilenglicol. Las formulaciones parenterales se pueden presentar en dosis unitarias o recipientes cerrados de múltiples dosis, tal como ampollas y viales, y se pueden almacenar en una condición secada por congelación (liofilizado) que requiere sólo la adición del excipiente líquido estéril, pro ejemplo, agua, para inyecciones, inmediatamente antes de su uso. Las soluciones de inyección extemporáneas pueden prepararse a partir de polvos estériles, gránulos, y comprimidos del tipo descrito previamente.

20 Los compuestos también se pueden administrar por vía tópica. Las regiones para la administración tópica incluyen la superficie de la piel y también los tejidos de membranas mucosas de la vagina, recto, nariz, boca y garganta. Las composiciones para la administración tópica a través de las membranas mucosas y piel no deberían dar lugar a signos de irritación, tal como hinchazón o enrojecimiento.

25 La composición tópica puede incluir un vehículo farmacéuticamente aceptable adaptado para la administración tópica. Por lo tanto, la composición puede tomar la forma de una suspensión, solución, pomada, loción, lubricante sexual, crema, espuma, aerosol, supositorio, implante, inhalante, comprimido, cápsula, polvo seco, jarabe, bálsamo o pastilla, por ejemplo. Los procedimientos para preparar tales composiciones son bien conocidos en la industria farmacéutica.

30 Los compuestos se pueden formular para la administración tópica a la epidermis como ungüentos, cremas o lociones, o como un parche transdérmico. Los ungüentos y cremas pueden, por ejemplo, ser formulados con una base acuosa u oleosa con la adición de adecuados agentes espesantes y/o agentes gelificantes. Las lociones pueden ser formuladas con una base acuosa u oleosa en general también contienen uno o más agentes emulsionantes, agentes estabilizantes, agentes dispersantes, agentes de suspensión, agentes espesantes, o agentes colorantes. Las formulaciones adecuadas para la administración tópica en la boca incluyen pastillas que comprenden agentes activos en una base aromatizada, normalmente sacarosa y acacia o tragacanto; pastillas que comprenden el ingrediente activo en una base inerte tal como gelatina y glicerina o sacarosa y goma arábiga; y enjuagues bucales que comprenden el ingrediente activo en un vehículo líquido adecuado.

35 Cremas, pomadas o pastas son formulaciones semisólidas del ingrediente activo para aplicación externa. Ellos se pueden hacer mezclando el ingrediente activo en forma finamente dividida o en polvo, solo o en solución o suspensión en un fluido acuoso o no acuoso, con la ayuda de maquinaria adecuada, con una base grasa o no grasa. La base puede comprender hidrocarburos tal como parafina dura, blanda o líquida, glicerina, cera de abejas, jabón metálico ; un mucílago ; un aceite de origen natural tal como aceite de almendras, maíz, cacahuete, ricino o oliva; grasa de lana o sus derivados o un ácido graso tal como ácido estérico u oleico junto con un alcohol tal como propilenglicol o un macrogel. La formulación puede incorporar cualquier agente activo superficial adecuado tal como un tensioactivo aniónico, catiónico o no iónico tal como éster de sorbitán o un derivado de polioxietileno del mismo. Los agentes de suspensión tal como gomas naturales, derivados de celulosa o materiales inorgánicos tal como sílices silíceas, y otros ingredientes tal como lanolina también pueden ser incluidos.

40 Las lociones incluyen aquellas adecuadas para la aplicación a la piel o el ojo. Una loción ocular puede comprender una solución acuosa estéril que opcionalmente contiene un bactericida y se puede preparar por procedimientos similares a aquellos para la preparación de gotas. Las lociones o linimentos para aplicación a la piel también pueden incluir un agente para acelerar el secado y enfriar la piel, tal como un alcohol o acetona, y un humectante tal como

glicerol o un aceite de ricino de tal como aceite o aceite de cacahuete.

#### Administración transdérmica

5 Los complejos modificadores químicos- agentes farmacéuticos que se describen en la presente memoria se pueden administrar por vía transdérmica. La administración transdérmica implica típicamente la entrega de un agente farmacéutica para el paso percutánea del fármaco en la circulación sistémica del paciente. Los sitios de la piel incluyen regiones anatómicas para la administración por vía transdérmica del medicamento e incluyen el antebrazo, abdomen, pecho, espalda, glúteos, zona mastoidal, y similares.

10 La administración transdérmica se lleva a cabo mediante la exposición de una fuente del complejo a la piel de un paciente durante un período prolongado de tiempo. Los parches transdérmicos tienen la ventaja añadida de proporcionar la entrega controlada de un complejo modificador químico-agente farmacéutico al cuerpo. Ver Transdermal Drug Delivery: Developmental Issues and Research Initiatives, Hadgraft y Guy (eds.), Marcel Dekker, Inc., (1989); Controlled Drug Delivery: Fundamentals and Applications, Robinson y Lee (eds.), Marcel Dekker Inc., (1987); y Transdermal Delivery of Drugs, Vols. 1-3, Kydonieus y Berner (eds.), CRC Press, (1987). Tales formas de dosificación se pueden preparar por disolución, dispersión, o de otra manera incorporando el complejo modificador químico-agente farmacéutico en un medio adecuado, de tal como un material de matriz elastomérica. Los potenciadores de la absorción también pueden ser usados para aumentar el flujo del compuesto a través de la piel. La velocidad de tal flujo puede ser controlada proporcionando una velocidad de control de membrana o dispersando el compuesto en una matriz polimérica o gel

#### Administración transdérmica pasiva del fármaco

20 Una variedad de tipos de parches transdérmicos encontrará uso en los procedimientos que se describen en el presente documento. Por ejemplo, un parche adhesivo simple se puede preparar a partir de un material de soporte y un adhesivo de acrilato. El complejo modificador químico-agente farmacéutico y cualquier potenciador se formulan generando la solución de colada adhesiva y se deja mezclar bien. La solución se cuele directamente sobre el material de soporte y el disolvente de colada se evapora en un horno, dejando una película adhesiva. El forro de liberación puede estar unido para completar el sistema.

25 Alternativamente, un parche matriz de poliuretano puede ser empleado para entregar el complejo modificador químico- agente farmacéutico. Las capas de este parche comprenden un respaldo, una matriz de fármaco poliuretano / intensificador, una membrana, un adhesivo, y un forro de liberación. La matriz de poliuretano se prepara utilizando un curado a temperatura ambiente de prepolímero de poliuretano. La adición de agua, alcohol, y complejos al prepolímero resulta en la formación de un elastómero firme pegajoso que puede colar directamente sólo el material de soporte

Otra realización utilizará un parche de matriz de hidrogel. Típicamente, la matriz de hidrogel comprenderá alcohol, agua, fármacos y varios polímeros hidrófilos. Esta matriz de hidrogel se puede incorporar en un parche transdérmico entre el soporte y la capa de adhesivo.

35 El parche de depósito de líquido también encuentra su uso en procedimientos que se describen en la presente memoria. Este parche comprende un material de soporte termosellable impermeable o semipermeable, una membrana termosellable, un adhesivo de piel sensible a la presión a base de acrilato y un forro antiadherente siliconado. El soporte es sellado con calor a la membrana para formar un depósito que entonces se puede llenar con una solución del complejo, potenciadores, agente gelificante, y otros excipientes de calor.

40 Los parches de matriz de espuma son similares en diseño y los componentes para el sistema de depósito de líquido, excepto que la solución del modificador químico-agente farmacéutico gelificado está limitado en una capa de espuma delgada, típicamente un poliuretano. Esta capa de espuma se encuentra entre el soporte y la membrana que han sido sellados con calor en la periferia del parche.

45 Para los sistemas de administración pasivos, la velocidad de liberación se controla típicamente por una membrana colocada entre el depósito y la piel, por difusión desde un dispositivo monolítico, o por la propia piel que sirve como una barrera que controla la velocidad en el sistema de administración. Véanse las patentes de EE.UU. Nos. 4.816.258; 4.927.408; 4.904.475; 4.588.580, 4.788.062; y similares. La velocidad de suministro de fármaco dependerá, en parte, de la naturaleza de la membrana. Por ejemplo, la velocidad de administración de fármacos a través de membranas dentro del cuerpo es generalmente más alta que a través de barreras dérmicas. La velocidad en la que el complejo se administra desde el dispositivo a la membrana se controla más ventajosamente mediante el uso de membranas limitantes de velocidad que se colocan entre el depósito y la piel. Suponiendo que la piel es suficientemente permeable para el complejo (es decir, la absorción a través de la piel es mayor que la velocidad de paso a través de la membrana), la membrana servirá para controlar la velocidad de dosificación experimentada por el paciente.

55 Los materiales de membrana permeables adecuados pueden seleccionarse basándose en el grado deseado de permeabilidad, la naturaleza del complejo, y las consideraciones mecánicas relacionadas con la construcción del dispositivo. Los materiales de membrana permeables ejemplares incluyen una amplia variedad de polímeros

naturales y sintéticos, tal como polidimetilsiloxanos (cauchos de silicona), copolímero de acetato de etilvinilo (EVA), poliuretanos, copolímeros de poliéter-poliuretano, polietilenos, poliamidas, cloruros de polivinilo (PVC), polipropilenos, policarbonatos, politetrafluoroetileno (PTFE), materiales celulósicos, por ejemplo, triacetato de celulosa y nitrato / acetato de celulosa, y hidrogeles, por ejemplo, 2-hidroxietilo (HEMA).

- 5 Otros artículos pueden estar contenidos en el dispositivo, tal como otros componentes convencionales de productos terapéuticos, dependiendo de las características de los dispositivos deseados. Por ejemplo, las composiciones de acuerdo a esta invención pueden incluir también uno o más conservantes o agentes bacteriostáticos, por ejemplo, hidroxibenzoato de metilo, hidroxibenzoato de propilo, clorocresol, cloruros de benzalconio, y similares. Estas composiciones farmacéuticas también pueden contener otros principios activos tal como agentes antimicrobianos, particularmente antibióticos, anestésicos, analgésicos, agentes antipruriginosos.

Los compuestos pueden formularse para la administración como supositorios. Una cera de bajo punto de fusión, tal como una mezcla de glicéridos de ácidos grasos o manteca de cacao primero se funde y el componente activo se dispersa homogéneamente, por ejemplo, por agitación. La mezcla homogénea fundida se vierte entonces en moldes de tamaño conveniente, se deja enfriar, y solidificar.

- 15 El compuesto activo se puede formular en un supositorio que comprende, por ejemplo, aproximadamente 0,5% a aproximadamente 50% de un compuesto de la invención, dispuesto en un vehículo de glicol de polietileno (PEG) (por ejemplo, PEG 1000 [96%] y PEG 4000 [4%]).

Los compuestos pueden formularse para la administración vaginal. Pesarios, tampones, cremas, geles, pastas, espumas o pulverizaciones que contienen además del principio activo los vehículos tal como se conocen en la técnica por ser apropiados.

- 20 Los compuestos pueden formularse para la administración nasal. Las soluciones o suspensiones se aplican directamente a la cavidad nasal por medios convencionales, por ejemplo con un gotero, pipeta o pulverización. Las formulaciones se pueden proporcionar en forma individual o multidosis. En el último caso de un gotero o pipeta, esto puede conseguirse por el paciente administrando un volumen predeterminado apropiado de la solución o suspensión. En el caso de un pulverizador esto se puede conseguir por ejemplo por medio de una bomba de pulverización de atomización dosificadora.

- Los compuestos pueden formularse para la administración en aerosol, particularmente al tracto respiratorio e incluyendo la administración intranasal. El compuesto tendrá generalmente un pequeño tamaño de partícula por ejemplo del orden de 5 micras o menos. Tal tamaño de partícula puede obtenerse por medios conocidos en la técnica, por ejemplo por micronización. El principio activo se proporciona en un envase presurizado con un propelente adecuado tal como un clorofluorocarbono (CFC) por ejemplo diclorodifluorometano, triclorofluorometano, o diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas adecuado. El aerosol también puede contener convenientemente un tensioactivo tal como lecitina. La dosis de fármaco puede controlarse mediante una válvula calibrada. Alternativamente, los principios activos pueden proporcionarse en una forma de polvo seco, por ejemplo una mezcla de polvo del compuesto en una base en polvo apropiada tal como lactosa, almidón, derivados de almidón tal como hidroxipropilmetilcelulosa y polivinilpirrolidona (PVP). El vehículo en polvo formará un gel en la cavidad nasal. La composición en polvo puede presentarse en forma de dosis unitarias por ejemplo en cápsulas o cartuchos de, por ejemplo, gelatina o en envases tipo blíster a partir del cual el polvo se puede administrar por medio de un inhalador.

- 40 Cuando se desee, las formulaciones pueden prepararse con recubrimientos entéricos adaptados para la administración de liberación sostenida o controlada del principio activo.

Las preparaciones farmacéuticas están preferentemente en formas de dosificación unitarias. En tal forma, la preparación se subdivide en dosis unitarias que contienen cantidades apropiadas del componente activo. La forma de dosificación unitaria puede ser una preparación envasada, conteniendo el envase cantidades discretas de la preparación, comprimidos envasados tal como, cápsulas, y polvos en viales o ampollas. También, la forma de dosificación unitaria puede ser una cápsula, comprimido, sello o pastilla, o puede ser el número apropiado de cualquiera de éstos en forma envasada.

#### Sales farmacéuticamente aceptables

- 50 También se describen sales farmacéuticamente aceptables de los presente compuestos en las que pueden prepararse. Estas sales serán aquellas que son aceptables en su aplicación para un uso farmacéutico. Mediante sello se quiere decir que la sal retendrá la actividad biológica del compuesto original y la sal no tendrá efectos adversos o deletéreos en su aplicación y uso en el tratamiento de enfermedades.

Las sales farmacéuticamente aceptables se preparan de una manera estándar. Si el compuesto parental es una base, el mismo se trata con un exceso de un ácido orgánico o inorgánico en un disolvente adecuado. Si el compuesto parental es un ácido, el mismo se trata con una base inorgánica u orgánica en un disolvente adecuado.

Los compuestos se pueden administrar en forma de un metal alcalino o sal de metal alcalino térreo del mismo,

concurrentemente, simultáneamente, o junto con un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable, especialmente y preferentemente s en la forma de una composición farmacéutica del mismo, ya sea por vía oral, rectal, o parenteral (incluyendo la subcutánea), en una cantidad eficaz.

5 Los ejemplos de sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables para su uso en la composición farmacéutica incluyen aquellas derivadas de ácidos minerales, tal como ácidos clorhídrico, bromhídrico, fosfórico, metafosfórico, nítrico y sulfúrico, y ácidos orgánicos, tal como ácidos tartárico, acético, cítrico, málico, láctico, fumárico, benzoico, glicólico, glucónico, succínico, p-toluenosulfónico, y arilsulfónico, por ejemplo.

Por consiguiente, en un aspecto una composición farmacéutica comprende un agente como se define en la presente memoria más arriba.

10 En una realización la composición farmacéutica como se define en la presente memoria más arriba comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En una realización el pH de la composición farmacéutica como se define en la presente memoria más arriba está entre pH 5 y pH 9.

15 En una realización la composición farmacéutica como se define en la presente memoria más arriba se formula para la administración por inyección, supositorio, administración oral, comprimido sublingual o pulverizador, administración cutánea, inhalación o para la administración local utilizando una cápsula biocompatible implantable.

En otra realización la inyección es la intravenosa, intramuscular, intraespinal, intraperitoneal, subcutánea, un bolo o una administración continua

En una realización la composición farmacéutica se administra en intervalos de 30 minutos a 24 horas.

20 En otra realización la composición farmacéutica se administra en intervalos de 1 a 6 horas.

En una realización, la composición farmacéutica como se define en la presente memoria más arriba se administra en intervalos de 6 a 24 horas.

En otra realización la composición farmacéutica se administra en intervalos de 6 a 72 horas.

25 En otra realización, la composición farmacéutica como se define en la presente memoria más arriba se administra en intervalos de 1 a 7 días, tal como cada 2 días, por ejemplo cada 4 días, tal como cada 6 días.

En una realización, la duración del tratamiento con la composición farmacéutica como se define en la presente memoria más arriba es de 1 a 52 semanas.

En una realización, la duración del tratamiento con la composición farmacéutica como se define en la presente memoria más arriba es de 25 a 104 semanas.

30 En una realización, la duración del tratamiento con la composición farmacéutica como se define en la presente memoria más arriba es 2 a 7 años.

En una realización, la duración del tratamiento con la composición farmacéutica como se define en la presente memoria más arriba es de por vida.

35 En una realización la composición farmacéutica que comprende el antagonista/inhibidor del receptor de dominio Vps10p de acuerdo a la presente invención se administra en una dosificación de entre 10 µg a 500 mg por kg de masa corporal.

En otra realización, la dosificación del principio activo de la composición farmacéutica está entre 10 µg a 500 mg por kg de masa corporal, tal como 20 µg a 400 mg por kg de masa corporal, por ejemplo de 50 µg a 200 mg por kg de masa corporal, tal como de 70 µg a 100 mg por kg de masa corporal.

40 **Segundo principio activo**

En una realización la composición farmacéutica como se define en la presente memoria más arriba comprende un segundo principio activo.

En otra realización dicho segundo principio activo se selecciona del grupo que consiste en antidepresivos, anticonvulsivos, anestésicos locales, opiodes, antagonistas de NMDA, Tramadol, capsazepina, y capsaicina.

45 En otra realización los antidepresivos como se define en la presente memoria más arriba se seleccionan del grupo que consiste en antidepresivos tricíclicos y amitriptilina.

En otra realización los anticonvulsivos como se define en la presente memoria más arriba se seleccionan del grupo que consiste en Gabapentina, carbamazepina, fenioina, y lamotrigina.

En otra realización los anestésicos locales como se define en la presente memoria más arriba se seleccionan del grupo que consiste en Lidocaina y mexiletina.

En otra realización los opioides como se define en la presente memoria más arriba se seleccionan del grupo que consiste en morfina, fentanil y oxycodona.

- 5 En otra realización los antagonistas de NMDA como se define en la presente memoria más arriba se seleccionan del grupo que consiste en ketamina, memantina y amantadina.

En un aspecto importante también se describe el uso de al menos un agente como se define en la presente memoria más arriba en el que dicho agente es capaz de inhibir la expresión del receptor de dominio Vps10p o un receptor Trpv o un receptor TrkA en un animal.

10 **Kit de partes**

También se describe un kit en partes que comprende:

- una composición farmacéutica como se define en la presente memoria más arriba
- un instrumento médico u otro medio para administrar el medicamento
- instrucciones sobre cómo utilizar el kit en partes.

- 15 - opcionalmente un segundo principio activo como se define en la presente memoria más arriba

También se describe un procedimiento de tratamiento de dolor en un sujeto que comprende administrar a un individuo que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición farmacéutica en la presente memoria más arriba.

- 20 También se describe un procedimiento para el tratamiento de neuropatía administrando a un individuo que lo necesita una cantidad suficiente del agente como se define en la presente memoria más arriba.

Se entiende que el experto sabrá cómo aplicar el uso del agente para la preparación de un medicamento para el tratamiento de dolor, como se define en la presente memoria más arriba, a un procedimiento para tratar el dolor en un individuo que lo necesita.

**Procedimiento comercial**

- 25 También se describe un procedimiento para la comercialización de un medicamento, comprendiendo dicho producto al menos un agente aislado, siendo dicho agente capaz de inhibir la formación del:

- a. complejo binario del receptor de dominio Vps10p : receptor Trpv, y/o
- b. complejo ternario del receptor de dominio Vps10p : TrkA : receptor Trpv,

- 30 siendo por tanto útil en un procedimiento para el tratamiento de dolor en un sujeto, comprendiendo dicha comercialización la difusión pública de la información que la inhibición de la formación de dicho complejo tiene un impacto en la sensación de dolor en dicho sujeto.

Descripción detallada de los dibujos

Figura 1: la familia del receptor de dominio Vps10p. Esta indicada su organización estructural.

- 35 Figura 2: experimentos colP que demuestran la interacción física entre sortilina, TrkA y TrpVI en células HEK293 transfectadas doble con los receptores indicados. (A) sortilina y TrkA. (B) TRPV1 y TrkA o sortilina, respectivamente.

Figura 3: Representación esquemática de complejos diméricos y triméricos entre Sortilina, TrkA y TrpVI en la membrana plasmática. (A) Sortilina y TrpVI. (B) TrkA y TrpVI. (C) Sortilina, TrkA y TrpVI, indicado con TrkA como componente intermedio. (D) Sortilina, TrkA y TrpVI indicado con TrpVI como componente central.

- 40 Figura 4: Datos de inmunofluorescencia y estereológicos que demuestran la expresión de sortilina, TrkA y TrpVI en los cuerpos celulares de las neuronas sensoriales en los ganglios radicales posteriores (DRG). (A) recuento de % de perfiles neuronales positivos de cada receptor en DRG. (B) Inmunohistología de DRG demostrando sortilina, TrkA y TrpVI en pequeñas neuronas sensoriales medianas en DRG

- 45 Figura 5: (A) ensayo de placa caliente y (B) ensayo de retirada de cola realizada en ratones con sortilina (+ / +) y con sortilina (-/-). La falta del receptor de sortilina resulta claramente en una mayor latencia hacia el estímulo térmico doloroso, de manera similar se observó el fenotipo en ratones TrpVI (-/-). (C) No se observó ningún cambio en la respuesta al estímulo mecánico (de von Frey) a partir de la pérdida de sortilina, en correspondencia a la observación de TrpVI (-/-), que ilustra que TrpVI sólo está implicada en la señalización del estímulo térmico/ químico y no

mecánico y la pérdida de sortilina tiene el mismo fenotipo selectivo.

Figura 6: Desarrollo de alodinia mecánica en la lesión del nervio ciático (SNI) operado en ratones (= 13) tipo salvaje (n = 10) y con sortilina (-/-). El umbral de retirada en la superficie plantar de la extremidad posterior se midió con filamentos von Frey tanto para la pata ipsilateral como contralateral (los datos como media + / - SEM). A partir del día 6 después de la cirugía se observó una significativa diferencia entre el ipsilateral tipo salvaje y contralateral tipo salvaje (p <0,001) mientras que la sortilina (-/-) fue incapaz de desarrollar la alodinia mecánica.

Figura 7: (A) Desarrollo de alodinia mecánica en Ligadura del Nervio Espinal (SNL) operado en ratones (n = 11) tipo salvaje (n = 9) y con sortilina (-/-). El umbral de retirada en la superficie plantar de la extremidad posterior se midió con filamentos de von Frey, tanto para la pata ipsilateral como contralateral. A partir del día después de la cirugía se observó una diferencia significativa entre ipsilateral tipo salvaje y contralateral tipo salvaje mientras que la sortilina (-/-) fue incapaz de desarrollar alodinia mecánica.

(B) Desarrollo de la hiperalgesia térmica en los ratones descritos en (A). El umbral de retirada de la extremidad posterior se midió por estimulación con una fuente de calor radiante (ensayo plantar de Stoelting, Procedimiento de Hargreaves) tanto para el la pata contralateral como ipsilateral. A partir del día después de la cirugía se observó una diferencia significativa entre el ipsilateral tipo salvaje y contralateral tipo salvaje mientras que la sortilina (- / -) fue incapaz de desarrollar hiperalgesia térmica.

Figura 8: Competición de agentes a base de péptidos de la invención con GST etiquetados en el extremo terminal C con los tres aminoácidos de neurotensina Tyr-Ile-Leu (YIL). La unión a Sortilina inmovilizada se midió por resonancia de plasmón superficial. 100% corresponde a las unidades de respuesta medida obtenidas para 100 nM GST-YIL en ausencia de péptido competidor. Los valores de EC50 corresponden a la concentración de péptido en la que la unión a GST-YIL se reduce a 50%. Las secuencias se dan para los péptidos, y también se muestra la estructura para los péptidos que contienen aminoácidos no naturales

#### Perspectiva general de secuencias

- SEC ID NO. 1: Sortilina
- 25 SEC ID NO. 2: SorLA
- SEC ID NO. 3: SorCS1
- SEC ID NO. 4: SorCS2
- SEC ID NO. 5: SorCS3
- SEC ID NO. 6: TrpVI
- 30 SEC ID NO. 7: TrpV2
- SEC ID NO. 8: TrpV3
- SEC ID NO. 9: TrpV4
- SEC ID NO. 10: TrkA

#### Ejemplos

35 Ejemplo 1: Determinación de si la Sortilina, TrkA y TrpVI son capaces de interactuar físicamente.

Células HEK293 establemente transfectadas con combinaciones de sortilina, TrkA y TrpVI se reticularon con DSP (Pierce) y los lisados celulares se sometieron a inmunoprecipitación utilizando anti-TrkA o anti-TrpVI (Santa Cruz Biotechnology) y perlas de Sepharose GammabindG (G & E Biosciences). El eluato IP y los lisados se sometieron a SDS-PAGE y Western Blot. Se demostraron los complejos de Sortilina-TrkA (Fig. 2A), TrpVI-sortilina y TrpVI-TrkA (Fig. 2B), lo que sugiere que estos receptores son capaces de la formación de complejos diméricos y triméricos entre sí.

Ejemplo 2: Determinación de si la inactivación de sortilina afecta la expresión de TrkA y TrpVI.

Los ratones adultos fueron decapitados, el DRG lumbar se diseccionó, se fijó y se crioseccionó a las 15 pm. La expresión de Sortilina, TrkA y TrpVI se realizó mediante la incubación con anticuerpo primario (anti-sortilina de Alomone Labs, anti-TrkA de Reichardt Lab en UCSF y anti-TRPV1 de Neuromics Lab) seguido por el anticuerpo secundario etiquetado con fluorescencia de Molecular Probes. Las muestras se cubrieron y las imágenes se adquirieron en un microscopio confocal Zeiss LSM510. La Figura 4b ilustra la expresión de sortilina, TrkA y TrpVI en las neuronas L4DRG y se puede ver que estas moléculas están todas expresadas en neuronas de tamaño pequeño y medio (= nociceptivas). No se observó ninguna diferencia en el número de neuronas positivas para TrkA y TrpVI entre ratones de tipo salvaje y con Sortilina (-/-), ambos demostraron un perfil de expresión como se demuestra en la

figura 4a (a excepción de sortilina que está ausente en ratones con sortilina (- / -) (datos no mostrados)).

Ejemplo 3: Determinación de la sensibilidad térmica y mecánica en la respuesta a la inactivación de sortilina

Ensayo de placa caliente: Ratones adultos (10-20 semanas de edad) fueron colocados en jaulas de acrílico transparente sobre la placa caliente (Buch & Holm, Dinamarca), fijada en 55 ° C. Se midió la latencia para responder con la lambida de la pata trasera y el ratón se retiró inmediatamente (Bannon y Malmberg (2007) Curr.Protoc.Neurosci. 41, 8.9.1-8.9.16). Cada animal se ensayó sólo una vez en el mismo día.

Ensayo de inmersión de cola: Los ratones hembra se inmovilizaron brevemente (1/2-1 min) en un tubo de contención durante el procedimiento. El tercio distal de la cola se sumergió en agua a 50°C y se midió la latencia para retirar la cola. Cada animal se ensayó sólo una vez en el mismo día.

Ensayo de von Frey: el umbral de retirada mecánica sobre la superficie plantar de las patas traseras se midió utilizando pelos de von Frey calibrados 0,008 g - 1,4 g (Touch-Test © Sensory Evaluators, North Coast Medical, CA). Los pelos de Von Frey que aumentaban la fuerza de flexión se aplicaron cada uno 5 veces para ambos lados de la zona de la extremidad trasera plantar desde abajo al suelo de malla, y se contó el número de retiradas.

Como se muestra en la Figura 5a y 5b, los ratones con sortilina (- / -) mostraron una disminución significativa en la respuesta al estímulo térmico respecto de la cola o pata trasera mientras que la respuesta a la estimulación mecánica fue inalterada. Este cambio en el fenotipo sensorial es paralelo a aquel observado en ratones con TrpVI (- / -), lo que sugiere fuertemente que la inactivación de sortilina da como resultado un fenotipo similar a aquel de TRPV1 (- / -) y por lo tanto que la sortilina está involucrada en la regulación funcional de TrpVI (Caterina et al. (2000) Science 288, 306-313).

Ejemplo 4: Determinación del desarrollo de alodinia mecánica después de la lesión del nervio ciático.

Los ratones adultos se anestesiaron y se sometieron a lesión selectiva unilateral del nervio (SNI) realizada por la ligadura del nervio ciático. Los siguientes 14 días los animales se sometieron a ensayo para el desarrollo de alodinia mecánica mediante la medición del umbral de retirada en la superficie plantar de la extremidad posterior medida con los filamentos de von Frey (como se describe en el ejemplo 3) tanto para la pata ipsilateral como contralateral. Como se ilustra en la Figura 6, fue evidente una diferencia significativa entre ipsilateral tipo salvaje y contralateral n tipo salvaje ( $p < 0,001$ ) después de 6 días, mientras que los ratones con sortilina (- / -) fueron protegidos contra la alodinia mecánica.

Ejemplo 5a: Demostración de un complejo de receptor Sortilina:TrkA:TrpVI.

Las células que expresan sortilina, TrkA y TrpVI, por ejemplo, después de la transfección con plásmidos que codifican los tres receptores, respectivamente, son reticulados con DSP (Pierce) y posteriormente son lisados. El lisado celular se incuba con el anticuerpo contra sortilina unido covalentemente a perlas de sefarosa. Los complejos precipitados se eluyen (eluato 1) a partir de las perlas lavadas (tampón ácido y posterior neutralización) y se someten a otra ronda de inmunoprecipitación utilizando anticuerpo anti-TrkA y las proteínas precipitadas se eluyen (eluato 2) con tampón de carga de SDS. El eluato 1 se compone de sortilina precipitada sola y/o sortilina-TrkA, complejos de sortilina-TrkA-TrpVI y sortilina-TrpVI mientras que el eluato 2 sólo contiene los complejos sortilina-TrkA y/o sortilina-TrkA-TrpVI. El análisis Western blot de TrpVI en el eluato 2 revela la formación de un complejo receptor ternario entre Sortilina, TrkA y TrpVI .

Ejemplo 5b: Un procedimiento de detección basado en células para identificar agentes que interrumpen la formación de complejos entre Sortilina y TrpV1, y/o Sortilina,TrkA y/o TrpVI, respectivamente.

La determinación de la unión, internalización o señalización por miembros de la familia del receptor de dominio Vps10p se puede realizar en los sistemas celulares. Las células que expresan sortilina, TrkA y TrpVI después de por ejemplo transfección con plásmidos que codifican los tres receptores, respectivamente, se incuban con un compuesto del agente candidato (inhibidor / antagonista ). Dicho agente puede, por ejemplo, representar un anticuerpo contra cualquiera de los receptores, ligandos de unión Sortilina y TrkA tal como proNGF, NGF o, fragmentos de los respectivos receptores. Después de la incubación, las células se lavan, complejos de proteínas se reticulan con DSP (Pierce) y posteriormente se lisan. El lisado celular se incuba con el anticuerpo contra sortilina unido covalentemente a perlas de sefarosa. Los complejos precipitados se eluyen (eluato 1) a partir de las perlas lavadas (tampón de ácido y posteriormente la neutralización) y ase someten a otra ronda de inmunoprecipitación utilizando anticuerpo anti- TrkA y proteínas precipitadas eluidas (eluido 2) con tampón de carga SDS. El eluato 1 se compone de sortilina precipitada sola y/o sortilina - TrkA, sortilina - TrpVI y complejos de sortilina - TrkA - TrpVI mientras que el eluato 2 sólo contiene sortilina - TrkA y/o complejos de sortilina - TrkA - TrpVI. El análisis Western blot de TrkA y TrpVI en eluato 1 revela si los compuestos candidatos son capaces de inhibir la formación de sortilina - TrkA y el complejo sortilina - TrpVI, respectivamente. El análisis Western blot de TrpVI en eluato 2 revela si los compuestos candidatos son capaces de inhibir la formación del complejo ternario sortilina - TrkA - TrpVI.

Ejemplo 5c: Un procedimiento de detección basado en células para identificar antagonistas de receptores que alteran la señalización por complejos que comprenden Sortilina y TRPV1, y Sortilina, TrkA y/o TRPV1,

respectivamente.

Las células que expresan sortilina y TrpVI con o sin TrkA, por ejemplo, después de la transfección con plásmidos que codifican los receptores relevantes se incuban en ausencia o presencia de antagonistas candidatos. Las células se monitorean posteriormente por cambios en influjo de calcio mediado por TRPV1 utilizando AM-Fura2. En resumen, las células transfectadas de manera estable con TrpVI, TrkA y Sortilina se colocan en una placa de cultivo de tejido de fondo transparente de 96 pocillos (Sigma) y se incuban en medio de Dulbecco de Eagle con 1  $\mu$ M AM-Fura2 (Molecular Probes) a 37 °C en la oscuridad durante 30 minutos. Antes de las mediciones de [Ca<sup>2+</sup>], las células se lavan tres veces y se incuban durante 30 minutos a temperatura ambiente (25 °C) en solución salina fisiológica tamponada con HEPES (HPSS : NaCl, 120 mM ; KCl, 5,4 mM ; Mg<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,8 mM ; HEPES, 20 mM ; CaCl<sub>2</sub>, 1,8 mM ; glucosa y, 10 mM ; con pH 7,4 ). Las células se estimulan con el agonista de TrpVI capsaicina y/o agonista de TrkA NGF y/o otros compuestos candidatos, la fluorescencia se monitorea de inmediato en un lector de placas Victor Multilabel (PerkinElmer) mediante excitación alternativamente mediante longitud de onda de 340 y 380 nm y midiendo la intensidad de fluorescencia de emisión a 510 nm. Todos los experimentos son conducidos a temperatura ambiente (25 °C) y se realizan dentro de 2 horas de carga para cada cubreobjetos. Los datos se expresan como la relación de fluorescencia de Fura2 debido a la excitación a 340 nm y aquella debido a la excitación a 380 nm (F340/F380 ). La eficacia de los antagonistas candidatos en NGF o el influjo de calcio estimulado con capsaicina se puede determinar comparando la actividad de AM-Fura2 en ausencia o presencia del antagonista que debe ser ensayado.

Ejemplo 5d: procedimiento de detección basado en vivo para la identificación de agentes que interrumpen la formación de complejos entre Sortilina y TRPV1, y/o Sortilina, TrkA y/o TrpVI, respectivamente.

A los ratones se administró un agente potencial (inhibidor o antagonista), por ejemplo por vía subcutánea en ausencia de la presencia de un agente potencial y se evalúa el dolor utilizando el ensayo de placa caliente, prueba de inmersión de cola, Ensayo de von Frey, o el modelo de lesión selectiva del nervio como se describe en los ejemplos 3 y 4, respectivamente. El ensayo también puede llevarse a cabo siguiendo la administración subcutánea de NGF a la pata para inducir el dolor. Si un antagonista demuestra ser eficaz debe ser capaz de obstaculizar la respuesta de dolor provocada en el ratón. Estudios similares pueden llevarse a cabo en ratones transgénicos que sobreexpresan sortilina. Tales animales son particularmente útiles, ya que muestran un aumento en la sensibilidad a los estímulos nocivos descritos más arriba.

Ejemplo 6: Un ensayo in vitro para la identificación de agentes que interrumpen la formación de complejos entre, Sortilina y TrpVI, y Sortilina, TrkA y/o TrpVI, respectivamente.

La determinación de la unión directa de un ligando tal como una molécula orgánica pequeña, un péptido o un receptor soluble incluyendo pero sin limitarse a Sortilina, TRPV y TrkA, a la proteína inmovilizada se puede realizar por ejemplo, análisis de resonancia de plasmón superficial (Biacore, Suecia) utilizando CaHBS como tampón de desarrollo estándar (HEPES 10 mM, pH 7,4, NaCl 140 mM, CaCl<sub>2</sub> 2 mM, EGTA 1 mM, y 0,005% de Tween-20). Un chip biosensor de Biacore (CMS, cat. no. BR-1000-14) se activa utilizando el procedimiento NHS / EDC tal como lo describe el proveedor, seguido por el revestimiento con receptor que pertenece al receptor de la familia de dominio Vps10p. Se pueden aplicar varias metodologías diferentes: Los agentes candidatos pueden ser identificados comparando la señal de unión (unidades de respuesta) con un chip inmovilizado con uno de los receptores y comparando esta señal con una célula de flujo de vacío. En otra metodología, la inhibición de un ligando establecido puede ser monitoreada en ausencia o presencia de inhibidores putativos. La diferencia en la señal representa el potencial inhibidor del antagonista. Los datos recogidos se analizaron mediante el ajuste de sensogramas para las estimaciones de afinidad y potencial inhibidor utilizando el programa Biaevaluation versión 3.1.

El ensayo de resonancia de plasmón de superficie puede ser fácilmente transformado en otros ensayos en los que el receptor de dominio de Vps10p, el ligando o el inhibidor putativo se inmoviliza sobre una fase sólida. Por ejemplo, los receptores pueden ser inmovilizados en, por ejemplo pocillos de microtitulación Maxisorp de Nunc (art. 439454) mediante incubación durante 16 horas a 4 °C en 50 mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 9.6. Después del bloqueo utilizando 5 % de albúmina de suero bovino (Sigma, n ° de cat A9647) durante 2 horas a temperatura ambiente, los pocillos se lavan tres veces con tampón MB (HEPES 10 mM, pH 7,4, NaCl 140 mM, CaCl<sub>2</sub> 2 mM, y 1 mM de MgCl<sub>2</sub>) antes de la incubación con un ligando etiquetado (por ejemplo yodado) en ausencia o presencia de varias concentraciones de un inhibidor candidato. Después de la incubación (por ejemplo durante la noche a 4 °C) y lavar con tampón MB, la radiactividad unida es liberada añadiendo SDS al 10%. Se determina la unión no específica de trazador para pozos cubiertos sólo con albúmina de suero bovino y se sustrae de los valores determinados en los experimentos de unión. El punto de datos de unión se puede ajustar a ecuaciones de unión utilizando el software Prism de GraphPad, versión 4. Del mismo modo, el antagonista puede ser etiquetado y la unión al receptor inmovilizado puede ser medida directamente. En otra configuración, el receptor, ligando o antagonista puede ser inmovilizado sobre perlas de centelleo y la unión medida en un ensayo de proximidad de centelleo en el que la molécula de unión al receptor ha sido etiquetada utilizando radiactividad.

Ejemplo 7: Un procedimiento de detección en base a células para identificar agentes capaces de inhibir un receptor de dominio Vps10p

Un antagonista dirigido contra una entidad complejo del receptor de dominio Vps10p: TRPV : TrkA puede actuar como un inhibidor de todo el complejo. Por consiguiente , es relevante para la detección de agentes capaces de unirse a, por ejemplo la entidad receptor de dominio Vps10p. Dicho procedimiento se describe en el presente ejemplo .La determinación de la unión , internalización o señalización por miembros de la familia del receptor de dominio Vps10p se puede realizar en los sistemas celulares. Las células que expresan uno de los receptores, ya sea en forma endógena o después de, por ejemplo, la transfección con un plásmido que contiene el ADNc del receptor, se incuban con un ligando marcado radiactivamente, en ausencia y presencia respectivamente , de un compuesto inhibidor candidato / antagonista. Después de la incubación, las células se lavan para eliminar la unión no específica y posteriormente se cosechan. El grado de unión del antagonista candidato/inhibidor al receptor se determina utilizando un ensayo de radioligando convencional bien conocido por los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo Bylund y Toews (1993) Am J Physiol. 265(5 Pt 1):L421-9 titulado "Radioligand binding methods: practical guide y tips". Del mismo modo , la endocitosis/internalización puede ser determinada tal como se describe en Nykjaer et al (1992) FEBS Letters 300:13-17, y en Nielsen et al (2001) EMBO J., 20:2180.

Ejemplo 8: Procedimientos de tratamiento (no forma parte de la invención)

El agente activo desarrollado resultante de origen peptídico (basado en posible anticuerpo) liofilizado para ser disuelto antes de su uso o como una solución lista para usar de manera que se puede proporcionar por la vía de administración parenteral (por ejemplo por vía intravenosa (IV), intramuscular (IM) o subcutánea (SC). La aplicación a mucosa de una forma de dosis sólida también representa una posibilidad en este caso.

Si el agente activo desarrollado resultante es de origen químico se prepara una formulación para la administración oral, así como una vía potencial por ejemplo, para el uso S.C. o I. M..

El medicamento desarrollado se utiliza para fines profilácticos o se proporciona crónicamente para el tratamiento de por vida. En el primer caso el agente activo interfiere con, y de ese modo impide, el proceso de eventos moleculares que se produzcan lo que lleva a la reducción crónica de umbral de dolor. El medicamento desarrollado también está previsto para que sea proporcionado antes de una operación planificada o tan rápido como sea posible después de una lesión que implique el tejido nervioso.

En caso de que en ese momento se desarrolle una prueba genética para el diagnóstico de los individuos con predisposición a desarrollar dolor neuropático, el medicamento debe utilizarse cuando fuera posible en relación con un diagnóstico de este tipo, por ejemplo como un tratamiento teranóstico

Teniendo una condición de dolor crónico tal como dolor neuropático desarrollado, es decir, se ha producido el nivel de umbral de activación, el tratamiento crónico con el medicamento representa otra posibilidad. La justificación razonada es constantemente ser capaz de suprimir los eventos moleculares manteniendo el umbral de dolor nociceptivo bajo.

Finalmente, será posible para co-administrar el medicamento junto con tratamientos convencionales para el dolor neuropático por ejemplo, con opiáceos, fármacos anti-inflamatorios no esteroides, anticonvulsivos, antidepresivos tricíclicos y bloqueadores de canales Na +.

Ejemplo 8A: Tratamiento profiláctico en caso de lesión accidental del nervio (no forma parte de la invención)

Una mujer de 52 años de edad, se lleva al hospital 30 minutos después de un accidente de tráfico en el que se lesionó el brazo y el hombro y exhibe dolor severo. El examen objetivo revela que varios músculos del brazo lesionado se paralizan.

Para prevenir el desarrollo de dolor neuropático una inyección subcutánea del agente de la presente invención (por ejemplo, un anticuerpo), por ejemplo 1 mg / kg de peso corporal.

Para reducir el dolor del paciente se trata con opiáceos y NSAIDs. Durante los siguientes días se sigue el patrón dolor y si la intensidad del dolor el no se reduce dentro de los 5 días se repite el tratamiento con el agente de la presente invención.

Ejemplo 8B: Toracotomía planificada para el funcionamiento del corazón (no forma parte de la invención)

Un hombre de 60 años de edad, tiene que pasar por una cirugía de corazón abierto. Tiene antecedentes de dolor crónico con alodinia mecánica desde una fractura abierta en la pierna hace 20 años.

El paciente es propenso a desarrollar dolor neuropático después de la toracotomía por cuyo motivo el paciente 12 horas antes de la operación recibe el agente de la presente invención (por ejemplo, un anticuerpo) en una dosis de, por ejemplo 1 mg / kg de peso corporal como inyección subcutánea. El tratamiento se repite cuando el paciente se estabiliza después de la operación por ejemplo, 24 horas más tarde.

Durante los siguientes días se sigue el patrón de dolor y si la intensidad del dolor no se reduce dentro de 5 días se repite el tratamiento con el agente de la presente invención.

Ejemplo 8C: tratamiento de un paciente con síntomas de dolor neuropático (no forma parte de la invención)

Una mujer de 44 años de edad, con antecedentes de hiperalgesia y alodinia mecánica desarrolladas después de un accidente de tráfico en el que se lesionó el hombro, con la consiguiente parálisis de m. subescapular y m. supraespinoso busca ayuda para aliviar el dolor.

- 5 El paciente está en tratamiento con 2,800 mg de gabapentina diaria. El tratamiento amortigua la intensidad del dolor, pero aún así el dolor invalida la vida cotidiana. La intensidad del dolor se vuelve insoportable con el uso del brazo que luego exige opiáceos para amortiguar.

Además del tratamiento con gabapentina el paciente es tratado con el agente de la presente invención (por ejemplo, una molécula orgánica pequeña o un análogo de neurotensina sintética) por ejemplo, 100ug/kg de peso corporal una vez al día. Se obtiene un buen efecto y el paciente se encuentra en tratamiento de por vida.

10 Ejemplo 9: Determinación del desarrollo de alodinia mecánica e hiperalgesia térmica después de la ligadura del nervio espinal. (no forma parte de la invención)

Los ratones adultos fueron anestesiados y sometidos a lesión unilateral del nervio espinal (SNL) realizada por el corte de la parte distal del nervio espinal L5 al DRG. Los siguientes 12 días los animales se sometieron a ensayo para el desarrollo de la alodinia mecánica midiendo el umbral de retirada en la superficie plantar de las extremidades posteriores medida con filamentos de von Frey (como se describe en el ejemplo 3 y 4) tanto para la pata ipsilateral como la contralateral. Además, los animales se pusieron a prueba durante el mismo período de tiempo y tanto en las patas contralaterales como en las ipsilaterales para el desarrollo de hiperalgesia térmica mediante la exposición de las patas traseras a una fuente de calor radiante (Prueba Plantar de Stoelting, procedimiento de Hargreaves) y midiendo la latencia de retirada de la pata.

Como se ilustra en la Figura 7a (alodinia mecánica) y 7b (hiperalgesia térmica), una diferencia significativa entre ipsilateral tipo salvaje y contralateral tipo salvaje era evidente sólo 1 día después de la cirugía, mientras que los ratones con sortilina (-/-) fueron protegidos contra la alodinia mecánica (Fig. 7a) y hiperalgesia térmica y (Fig. 7b).

## Referencias

- 25 [01] Dworkin, R.H. "An overview of neuropathic pain: syndromes, symptoms, signs, and several mechanisms", Clin. J. Pain 18:343-349 (2002)
- [02] Green, B.G. "Temperature perception and nociception", J. Neurobiol 61:13-29. (2004.)
- [03] Tegeder, I., Costigan, M., Griffin, R.S., Abele, A., Belfer, I., Schmidt, H., Ehnert, C., Nejm, J., Marian, C., Scholz, J., Wu, T., Allchorne, A., Diatchenko, L., Binshtok, A.M., Goldman, D., Adolph, J., Sama, S., Atlas, S.J., Carlezon, W.A., Parsegian, A., Lotsch, J., Fillingim, R.B., Maixner, W., Geisslinger, G., Max, M.B., Woolf, C.J. "GTP cyklohydrolase and tetrahydrobiopterin regulate pain sensitivity and persistence", Nature Medicine 1:1269-77 (2006).
- 30 [04] Bisgaard, T., Rosenberg, J and Kejlet, H. "From acute to clinic pain after Laparoscopic cholecystectomy: a prospective follow-up analysis". Scand. J Gastroenrol. 40:1358-1364 (2005)
- [05] Devor, M. & Seltzer, Z. Textbook of pain. Wall, P.D. & Melzack, R.(eds.). Elsevier Science (1999).
- 35 [06] Raja, S.N., Meyer, R.A., Ringkamp, M., & Campbell, J.N. Textbook of pain. Wall, P.D. & Melzack, R.(eds.). Elsevier Science (1999).
- [07] Jensen, T.S. & Baron, R. "Translation of symptoms and signs into mechanisms in neuropathic pain", Pain 102:1-8 (2003).
- [08] Zimmermann, M. "Pathobiology of neuropathic pain", Eur. J. Pharmacol. 429:23-37 (2001)
- 40 [09] Dickensen, A.H., Matthews, E.A. & Suzuki, R. Neurobiology of neuropathic pain: mode of action of anticonvulsants. European Journal of Pain-London 6.
- [010] [10] Lai, J., Porreca, F., Hunter, J.C. & Gold, M.S. "Voltage-gated sodium channels and hyperalgesia", Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 44:371-397 (2004)
- [011] McCleane, G. "Pharmacological management of neuropathic pain", CNS. Drugs 17:1031-1043 (2003)
- 45 [012] Mattia, C. & Coluzzi, F. "Antidepressants in chronic neuropathic pain", Mini. Rev. Med. Chem. 3:773-784 (2003)
- [013] Tamayo, N., Liao, H., Stec, M.M., Wang, X., Chakrabarti, P., Retz, D., Doherty, E.M., Surapaneni, S., Tamir, R., Bannon, A.W., Gavva, N.R., Norman, M.H. "Design and synthesis of peripherally restricted transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) antagonists", J.Med Chem. 2008, 51:2744-57).

- [014] Scholz, J. and Woolf, C.J. "Can we conquer pain?" *Nat Neurosci* 5 Suppl. 1062-7
- [015] Hald, A., Nedergaard, S., Hansen, R.R., Ding, M., Heegaard, A.-M. "Differential activation of spinal cord glial cells in murine models of neuropathic and cancer pain", *Eur. J. Pain* in press (2008)
- 5 [016] Smeyne, R.J., Klein, R., Schnapp, A., Long, L.K., Bryant, S., Lewin, A., Lira, S.A. Barbacid, M. "Severe sensory and sympathetic neuropathies in mice carrying a disrupted Trk/NGF receptor gene", *Nature* 368:246-9 (1994).
- [017] Arnett, M.G., Ryals, J.M., Wright, D.E. "pro-NGF, sortilin, and p75<sup>TR</sup>: Potential mediators of injury-induced apoptosis in the ratón dorsal root ganglion". *Brain Research* 1183:32-42 (2007).
- [018] Petersen et al., *J. Biol. Chem.*, 272:3599-3605 (1997)
- 10 [019] Herman-Borgmeyer et al., *Mol. Brain Res.*, 65:216-219 (1999)
- [020] Jacobsen et al., *J. Biol. Chem.*, 271:31379-31383 (1996)
- [021] Marcusson, E.G., et al., *Cell*, 77:579-586 (1994)
- [022] J. Mazella et al., *J Biol Chem* 273, 26273 (1998).
- [023] C. Munck Petersen et al., *Embo J* 18, 595 (1999).
- 15 [024] Nykjaer et al., *Nature* 427, 843 (2004).
- [025] H. K. Teng et at., *J Neurosci* 25, 5455 (2005).
- [026] U. B. Westergaard et at., *J Biol Chem* 279, 50221 (2004).
- [027] S. Maeda et at., *J Cell Physiol* 193, 73 (2002).
- [028] M. S. Nielsen, C. Jacobsen, G. Olivecrona, J. Gliemann, C. M. Petersen, *J Biol Chem* 274, 8832 (1999).
- 20 [029] M. S. Nielsen et al., *Embo J* 20, 2180 (2001).
- [030] K. Nakamura, K. Namekata, C. Harada, T. Harada, *Cell Death Differ* 14, 1552 (2007).
- [031] P. Jansen et at., *Nat Neurosci* 10, 1449 (2007).
- [032] P. Chalon et at., *FEBS Lett* 386, 91 (1996).
- [033] L. Jacobsen et al., *J Biol Chem* 276, 22788 (2001).
- 25 [034] K. Tanaka, M. Masu, S. Nakanishi, *Neuron* 4, 847 (1990).
- [035] J. P. Vincent, J. Mazella, P. Kitabgi, *Trends Pharmacol Sci* 20, 302 (1999).
- [036] Willer et at. (2008) *Nature Genetics* 40(2): 161-169
- [037] Kathiresan et al. (2008) *Nature Genetics* 40(2): 189-97
- 30 [038] U.B. Westergaard, K. Kirkegaard, E.S. Sorensen, C. Jacobsen, M.S. Nielsen, C.M. Petersen, P. Madsen, (2005) *FEBS Letters* 579:1172-1176
- [039] Chao, M.V. "Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways", *Nat Rev Neurosci.* 4:299-309 (2003)
- [040] Huang, E.J., Reichardt, L.F. "Trk receptors: roles in neuronal signal transduction", *Annu Rev Biochem.* 72:609-42 (2003)
- 35 [041] Huang, E.J., Reichardt, L.F. "Neurotrophins: roles in neuronal development and function", *Annu Rev Neurosci.* 24:677-736 (2001)
- [042] Chuang, H.H., Prescott, E.D., Kong, H., Shields, S., Jordt, S.E., Basbaum, A.I., Chao, M.V., Julius, D. "Bradykinin and nerve growth factor release the capsaicin receptor from PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>-mediated inhibition", *Nature* 411:957-62 (2001).
- 40 [043] Dhaka, A., Viswanath, V., Patapoutian, A. "Trp ion channels and temperature sensation", *Annu Rev Neurosci.* 29:135-61 (2006)

[044] Patapoutian, A., Peier, A.M., Story, G.M., Viswanath, V. "ThermoTRP channels and beyond: mechanisms of temperature sensation" *Nature Reviews Neuroscience* 4:529-539 (2003)

**LISTA DE SECUENCIAS**

- <110> NeuronIcon ApS
- 5 <120> Modulación del sistema receptor de dominio Vps 10p/receptor Trpv/receptor TrkA para el tratamiento del dolor
- <130> P1896PC00
- <150> PA 2008 00880
- 10 <151> 25-06-2008
- <150> 61/075,627
- <151> 25-06-2008
- 15 <160> 10
- <170> PatentIn versión 3.5
- 20 <210> 1
- <211> 831
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- 25 <220>
- <221> SEÑAL
- <222> (1)..(33)
- <223> Péptido señal de Sortilina
- 30 <220>
- <221> PROPEP
- <222> (34)..(77)
- 35 <223> Propéptido de Sortilina
- <220>
- <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
- 40 <222> (78)..(755)
- <223> Parte extracelular de la Sortilina (sortilina)
- <220>
- <221> TRANSMEM
- <222> (756)..(778)
- <223> Parte de la sortilina que atraviesa la membrana
- 45 <220>
- <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
- <222> (779)..(831)
- <223> Dominio intracelular (citoplasmático) de Sortilina
- 50 <220>
- <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
- <222> (779)..(831)
- <223> Dominio intracelular (citoplasmático) de Sortilina
- 55 <400> 1

ES 2 464 459 T3

Met Glu Arg Pro Trp Gly Ala Ala Asp Gly Leu Ser Arg Trp Pro His  
1 5 10 15

Gly Leu Gly Leu Leu Leu Leu Leu Gln Leu Leu Pro Pro Ser Thr Leu  
20 25 30

Ser Gln Asp Arg Leu Asp Ala Pro Pro Pro Ala Ala Pro Leu Pro  
35 40 45

Arg Trp Ser Gly Pro Ile Gly Val Ser Trp Gly Leu Arg Ala Ala Ala  
50 55 60

Ala Gly Gly Ala Phe Pro Arg Gly Gly Arg Trp Arg Arg Ser Ala Pro



ES 2 464 459 T3

Ile Leu Ala Ala Asn Asp Asp Met Val Phe Met His Val Asp Glu Pro  
 355 360 365

Gly Asp Thr Gly Phe Gly Thr Ile Phe Thr Ser Asp Asp Arg Gly Ile  
 370 375 380

Val Tyr Ser Lys Ser Leu Asp Arg His Leu Tyr Thr Thr Thr Gly Gly  
 385 390 395 400

Glu Thr Asp Phe Thr Asn Val Thr Ser Leu Arg Gly Val Tyr Ile Thr  
 405 410 415

Ser Val Leu Ser Glu Asp Asn Ser Ile Gln Thr Met Ile Thr Phe Asp  
 420 425 430

Gln Gly Gly Arg Trp Thr His Leu Arg Lys Pro Glu Asn Ser Glu Cys  
 435 440 445

Asp Ala Thr Ala Lys Asn Lys Asn Glu Cys Ser Leu His Ile His Ala  
 450 455 460

Ser Tyr Ser Ile Ser Gln Lys Leu Asn Val Pro Met Ala Pro Leu Ser  
 465 470 475 480

Glu Pro Asn Ala Val Gly Ile Val Ile Ala His Gly Ser Val Gly Asp  
 485 490 495

Ala Ile Ser Val Met Val Pro Asp Val Tyr Ile Ser Asp Asp Gly Gly  
 500 505 510

Tyr Ser Trp Thr Lys Met Leu Glu Gly Pro His Tyr Tyr Thr Ile Leu  
 515 520 525

Asp Ser Gly Gly Ile Ile Val Ala Ile Glu His Ser Ser Arg Pro Ile  
 530 535 540

Asn Val Ile Lys Phe Ser Thr Asp Glu Gly Gln Cys Trp Gln Thr Tyr  
 545 550 555 560

Thr Phe Thr Arg Asp Pro Ile Tyr Phe Thr Gly Leu Ala Ser Glu Pro  
 565 570 575

Gly Ala Arg Ser Met Asn Ile Ser Ile Trp Gly Phe Thr Glu Ser Phe  
 580 585 590

Leu Thr Ser Gln Trp Val Ser Tyr Thr Ile Asp Phe Lys Asp Ile Leu  
 595 600 605

Glu Arg Asn Cys Glu Glu Lys Asp Tyr Thr Ile Trp Leu Ala His Ser  
 610 615 620

ES 2 464 459 T3

Thr Asp Pro Glu Asp Tyr Glu Asp Gly Cys Ile Leu Gly Tyr Lys Glu  
625 630 635 640

Gln Phe Leu Arg Leu Arg Lys Ser Ser Val Cys Gln Asn Gly Arg Asp  
645 650 655

Tyr Val Val Thr Lys Gln Pro Ser Ile Cys Leu Cys Ser Leu Glu Asp  
660 665 670

Phe Leu Cys Asp Phe Gly Tyr Tyr Arg Pro Glu Asn Asp Ser Lys Cys  
675 680 685

Val Glu Gln Pro Glu Leu Lys Gly His Asp Leu Glu Phe Cys Leu Tyr  
690 695 700

Gly Arg Glu Glu His Leu Thr Thr Asn Gly Tyr Arg Lys Ile Pro Gly  
705 710 715 720

Asp Lys Cys Gln Gly Gly Val Asn Pro Val Arg Glu Val Lys Asp Leu  
725 730 735

Lys Lys Lys Cys Thr Ser Asn Phe Leu Ser Pro Glu Lys Gln Asn Ser  
740 745 750

Lys Ser Asn Ser Val Pro Ile Ile Leu Ala Ile Val Gly Leu Met Leu  
755 760 765

Val Thr Val Val Ala Gly Val Leu Ile Val Lys Lys Tyr Val Cys Gly  
770 775 780

Gly Arg Phe Leu Val His Arg Tyr Ser Val Leu Gln Gln His Ala Glu  
785 790 795 800

Ala Asn Gly Val Asp Gly Val Asp Ala Leu Asp Thr Ala Ser His Thr  
805 810 815

Asn Lys Ser Gly Tyr His Asp Asp Ser Asp Glu Asp Leu Leu Glu  
820 825 830

5 <210> 2  
<211> 2214  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

10 <220>  
<221> SIGNAL  
<222> (1)..(28)  
<223> Péptido señal de SorLA

15 <220>  
<221> PROPEP

ES 2 464 459 T3

<222> (29)..(81)

<223> Propéptido de SorLA

<400> 2

Met Ala Thr Arg Ser Ser Arg Arg Glu Ser Arg Leu Pro Phe Leu Phe  
 1 5 10 15  
 Thr Leu Val Ala Leu Leu Pro Pro Gly Ala Leu Cys Glu Val Trp Thr  
 20 25 30  
 Gln Arg Leu His Gly Gly Ser Ala Pro Leu Pro Gln Asp Arg Gly Phe  
 35 40 45  
 Leu Val Val Gln Gly Asp Pro Arg Glu Leu Arg Leu Trp Ala Arg Gly  
 50 55 60  
 Asp Ala Arg Gly Ala Ser Arg Ala Asp Glu Lys Pro Leu Arg Arg Lys  
 65 70 75 80  
 Arg Ser Ala Ala Leu Gln Pro Glu Pro Ile Lys Val Tyr Gly Gln Val  
 85 90 95  
 Ser Leu Asn Asp Ser His Asn Gln Met Val Val His Trp Ala Gly Glu  
 100 105 110  
 Lys Ser Asn Val Ile Val Ala Leu Ala Arg Asp Ser Leu Ala Leu Ala  
 115 120 125  
 Arg Pro Lys Ser Ser Asp Val Tyr Val Ser Tyr Asp Tyr Gly Lys Ser  
 130 135 140  
 Phe Lys Lys Ile Ser Asp Lys Leu Asn Phe Gly Leu Gly Asn Arg Ser  
 145 150 155 160  
 Glu Ala Val Ile Ala Gln Phe Tyr His Ser Pro Ala Asp Asn Lys Arg  
 165 170 175  
 Tyr Ile Phe Ala Asp Ala Tyr Ala Gln Tyr Leu Trp Ile Thr Phe Asp  
 180 185 190  
 Phe Cys Asn Thr Leu Gln Gly Phe Ser Ile Pro Phe Arg Ala Ala Asp  
 195 200 205  
 Leu Leu Leu His Ser Lys Ala Ser Asn Leu Leu Leu Gly Phe Asp Arg  
 210 215 220  
 Ser His Pro Asn Lys Gln Leu Trp Lys Ser Asp Asp Phe Gly Gln Thr  
 225 230 235 240  
 Trp Ile Met Ile Gln Glu His Val Lys Ser Phe Ser Trp Gly Ile Asp  
 245 250 255  
 Pro Tyr Asp Lys Pro Asn Thr Ile Tyr Ile Glu Arg His Glu Pro Ser  
 260 265 270

5

ES 2 464 459 T3

Gly Tyr Ser Thr Val Phe Arg Ser Thr Asp Phe Phe Gln Ser Arg Glu  
 275 280 285

Asn Gln Glu Val Ile Leu Glu Glu Val Arg Asp Phe Gln Leu Arg Asp  
 290 295 300

Lys Tyr Met Phe Ala Thr Lys Val Val His Leu Leu Gly Ser Glu Gln  
 305 310 315 320

Gln Ser Ser Val Gln Leu Trp Val Ser Phe Gly Arg Lys Pro Met Arg  
 325 330 335

Ala Ala Gln Phe Val Thr Arg His Pro Ile Asn Glu Tyr Tyr Ile Ala  
 340 345 350

Asp Ala Ser Glu Asp Gln Val Phe Val Cys Val Ser His Ser Asn Asn  
 355 360 365

Arg Thr Asn Leu Tyr Ile Ser Glu Ala Glu Gly Leu Lys Phe Ser Leu  
 370 375 380

Ser Leu Glu Asn Val Leu Tyr Tyr Ser Pro Gly Gly Ala Gly Ser Asp  
 385 390 395 400

Thr Leu Val Arg Tyr Phe Ala Asn Glu Pro Phe Ala Asp Phe His Arg  
 405 410 415

Val Glu Gly Leu Gln Gly Val Tyr Ile Ala Thr Leu Ile Asn Gly Ser  
 420 425 430

Met Asn Glu Glu Asn Met Arg Ser Val Ile Thr Phe Asp Lys Gly Gly  
 435 440 445

Thr Trp Glu Phe Leu Gln Ala Pro Ala Phe Thr Gly Tyr Gly Glu Lys  
 450 455 460

Ile Asn Cys Glu Leu Ser Gln Gly Cys Ser Leu His Leu Ala Gln Arg  
 465 470 475 480

Leu Ser Gln Leu Leu Asn Leu Gln Leu Arg Arg Met Pro Ile Leu Ser  
 485 490 495

Lys Glu Ser Ala Pro Gly Leu Ile Ile Ala Thr Gly Ser Val Gly Lys  
 500 505 510

Asn Leu Ala Ser Lys Thr Asn Val Tyr Ile Ser Ser Ser Ala Gly Ala  
 515 520 525

Arg Trp Arg Glu Ala Leu Pro Gly Pro His Tyr Tyr Thr Trp Gly Asp  
 530 535 540

ES 2 464 459 T3

His Gly Gly Ile Ile Thr Ala Ile Ala Gln Gly Met Glu Thr Asn Glu  
 545 555 560  
 Leu Lys Tyr Ser Thr Asn Glu Gly Glu Thr Trp Lys Thr Phe Ile Phe  
 565 570 575  
 Ser Glu Lys Pro Val Phe Val Tyr Gly Leu Leu Thr Glu Pro Gly Glu  
 580 585 590  
 Lys Ser Thr Val Phe Thr Ile Phe Gly Ser Asn Lys Glu Asn Val His  
 595 600 605  
 Ser Trp Leu Ile Leu Gln Val Asn Ala Thr Asp Ala Leu Gly Val Pro  
 610 615 620  
 Cys Thr Glu Asn Asp Tyr Lys Leu Trp Ser Pro Ser Asp Glu Arg Gly  
 625 630 635 640  
 Asn Glu Cys Leu Leu Gly His Lys Thr Val Phe Lys Arg Arg Thr Pro  
 645 650 655  
 His Ala Thr Cys Phe Asn Gly Glu Asp Phe Asp Arg Pro Val Val Val  
 660 665 670  
 Ser Asn Cys Ser Cys Thr Arg Glu Asp Tyr Glu Cys Asp Phe Gly Phe  
 675 680 685  
 Lys Met Ser Glu Asp Leu Ser Leu Glu Val Cys Val Pro Asp Pro Glu  
 690 700  
 Phe Ser Gly Lys Ser Tyr Ser Pro Pro Val Pro Cys Pro Val Gly Ser  
 705 710 715 720  
 Thr Tyr Arg Arg Thr Arg Gly Tyr Arg Lys Ile Ser Gly Asp Thr Cys  
 725 730 735  
 Ser Gly Gly Asp Val Glu Ala Arg Leu Glu Gly Glu Leu Val Pro Cys  
 740 745 750  
 Pro Leu Ala Glu Glu Asn Glu Phe Ile Leu Tyr Ala Val Arg Lys Ser  
 755 760 765  
 Ile Tyr Arg Tyr Asp Leu Ala Ser Gly Ala Thr Glu Gln Leu Pro Leu  
 770 775 780  
 Thr Gly Leu Arg Ala Ala Val Ala Leu Asp Phe Asp Tyr Glu His Asn  
 785 790 795 800  
 Cys Leu Tyr Trp Ser Asp Leu Ala Leu Asp Val Ile Gln Arg Leu Cys  
 805 810 815  
 Leu Asn Gly Ser Thr Gly Gln Glu Val Ile Ile Asn Ser Gly Leu Glu

ES 2 464 459 T3

|     |      |     |     |     |     |      |      |     |     |     |      |      |     |     |     |
|-----|------|-----|-----|-----|-----|------|------|-----|-----|-----|------|------|-----|-----|-----|
|     |      | 820 |     |     |     |      | 825  |     |     |     |      | 830  |     |     |     |
| Thr | Val  | Glu | Ala | Leu | Ala | Phe  | Glu  | Pro | Leu | Ser | Gln  | Leu  | Leu | Tyr | Trp |
|     |      | 835 |     |     |     |      | 840  |     |     |     |      | 845  |     |     |     |
| Val | Asp  | Ala | Gly | Phe | Lys | Lys  | Ile  | Glu | Val | Ala | Asn  | Pro  | Asp | Gly | Asp |
|     | 850  |     |     |     |     | 855  |      |     |     |     | 860  |      |     |     |     |
| Phe | Arg  | Leu | Thr | Ile | Val | Asn  | Ser  | Ser | Val | Leu | Asp  | Arg  | Pro | Arg | Ala |
| 865 |      |     |     |     | 870 |      |      |     |     | 875 |      |      |     |     | 880 |
| Leu | Val  | Leu | Val | Pro | Gln | Glu  | Gly  | Val | Met | Phe | Trp  | Thr  | Asp | Trp | Gly |
|     |      |     |     | 885 |     |      |      |     | 890 |     |      |      |     | 895 |     |
| Asp | Leu  | Lys | Pro | Gly | Ile | Tyr  | Arg  | Ser | Asn | Met | Asp  | Gly  | Ser | Ala | Ala |
|     |      |     | 900 |     |     |      |      | 905 |     |     |      |      | 910 |     |     |
| Tyr | His  | Leu | Val | Ser | Glu | Asp  | Val  | Lys | Trp | Pro | Asn  | Gly  | Ile | Ser | Val |
|     |      | 915 |     |     |     |      | 920  |     |     |     |      | 925  |     |     |     |
| Asp | Asp  | Gln | Trp | Ile | Tyr | Trp  | Thr  | Asp | Ala | Tyr | Leu  | Glu  | Cys | Ile | Glu |
|     | 930  |     |     |     |     | 935  |      |     |     |     | 940  |      |     |     |     |
| Arg | Ile  | Thr | Phe | Ser | Gly | Gln  | Gln  | Arg | Ser | Val | Ile  | Leu  | Asp | Asn | Leu |
| 945 |      |     |     |     | 950 |      |      |     |     | 955 |      |      |     |     | 960 |
| Pro | His  | Pro | Tyr | Ala | Ile | Ala  | Val  | Phe | Lys | Asn | Glu  | Ile  | Tyr | Trp | Asp |
|     |      |     |     | 965 |     |      |      |     | 970 |     |      |      |     | 975 |     |
| Asp | Trp  | Ser | Gln | Leu | Ser | Ile  | Phe  | Arg | Ala | Ser | Lys  | Tyr  | Ser | Gly | Ser |
|     |      |     | 980 |     |     |      |      | 985 |     |     |      |      |     | 990 |     |
| Gln | Met  | Glu | Ile | Leu | Ala | Asn  | Gln  | Leu | Thr | Gly | Leu  | Met  | Asp | Met | Lys |
|     |      | 995 |     |     |     |      | 1000 |     |     |     |      | 1005 |     |     |     |
| Ile | Phe  | Tyr | Lys | Gly | Lys | Asn  | Thr  | Gly | Ser | Asn | Ala  | Cys  | Val | Pro |     |
|     | 1010 |     |     |     |     | 1015 |      |     |     |     | 1020 |      |     |     |     |
| Arg | Pro  | Cys | Ser | Leu | Leu | Cys  | Leu  | Pro | Lys | Ala | Asn  | Asn  | Ser | Arg |     |
|     | 1025 |     |     |     |     | 1030 |      |     |     |     | 1035 |      |     |     |     |
| Ser | Cys  | Arg | Cys | Pro | Glu | Asp  | Val  | Ser | Ser | Ser | Val  | Leu  | Pro | Ser |     |
|     | 1040 |     |     |     |     | 1045 |      |     |     |     | 1050 |      |     |     |     |
| Gly | Asp  | Leu | Met | Cys | Asp | Cys  | Pro  | Gln | Gly | Tyr | Gln  | Leu  | Lys | Asn |     |
|     | 1055 |     |     |     |     | 1060 |      |     |     |     | 1065 |      |     |     |     |
| Asn | Thr  | Cys | Val | Lys | Glu | Glu  | Asn  | Thr | Cys | Leu | Arg  | Asn  | Gln | Tyr |     |
|     | 1070 |     |     |     |     | 1075 |      |     |     |     | 1080 |      |     |     |     |
| Arg | Cys  | Ser | Asn | Gly | Asn | Cys  | Ile  | Asn | Ser | Ile | Trp  | Trp  | Cys | Asp |     |
|     | 1085 |     |     |     |     | 1090 |      |     |     |     | 1095 |      |     |     |     |

ES 2 464 459 T3

Phe Asp Asn Asp Cys Gly Asp Met Ser Asp Glu Arg Asn Cys Pro  
 1100 1105 1110  
 Thr Thr Ile Cys Asp Leu Asp Thr Gln Phe Arg Cys Gln Glu Ser  
 1115 1120 1125  
 Gly Thr Cys Ile Pro Leu Ser Tyr Lys Cys Asp Leu Glu Asp Asp  
 1130 1135 1140  
 Cys Gly Asp Asn Ser Asp Glu Ser His Cys Glu Met His Gln Cys  
 1145 1150 1155  
 Arg Ser Asp Glu Tyr Asn Cys Ser Ser Gly Met Cys Ile Arg Ser  
 1160 1165 1170  
 Ser Trp Val Cys Asp Gly Asp Asn Asp Cys Arg Asp Trp Ser Asp  
 1175 1180 1185  
 Glu Ala Asn Cys Thr Ala Ile Tyr His Thr Cys Glu Ala Ser Asn  
 1190 1195 1200  
 Phe Gln Cys Arg Asn Gly His Cys Ile Pro Gln Arg Trp Ala Cys  
 1205 1210 1215  
 Asp Gly Asp Thr Asp Cys Gln Asp Gly Ser Asp Glu Asp Pro Val  
 1220 1225 1230  
 Asn Cys Glu Lys Lys Cys Asn Gly Phe Arg Cys Pro Asn Gly Thr  
 1235 1240 1245  
 Cys Ile Pro Ser Ser Lys His Cys Asp Gly Leu Arg Asp Cys Ser  
 1250 1255 1260  
 Asp Gly Ser Asp Glu Gln His Cys Glu Pro Leu Cys Thr His Phe  
 1265 1270 1275  
 Met Asp Phe Val Cys Lys Asn Arg Gln Gln Cys Leu Phe His Ser  
 1280 1285 1290  
 Met Val Cys Asp Gly Ile Ile Gln Cys Arg Asp Gly Ser Asp Glu  
 1295 1300 1305  
 Asp Ala Ala Phe Ala Gly Cys Ser Gln Asp Pro Glu Phe His Lys  
 1310 1315 1320  
 Val Cys Asp Glu Phe Gly Phe Gln Cys Gln Asn Gly Val Cys Ile  
 1325 1330 1335  
 Ser Leu Ile Trp Lys Cys Asp Gly Met Asp Asp Cys Gly Asp Tyr  
 1340 1345 1350

ES 2 464 459 T3

Ser Asp Glu Ala Asn Cys Glu Asn Pro Thr Glu Ala Pro Asn Cys  
 1355 1360 1365

Ser Arg Tyr Phe Gln Phe Arg Cys Glu Asn Gly His Cys Ile Pro  
 1370 1375 1380

Asn Arg Trp Lys Cys Asp Arg Glu Asn Asp Cys Gly Asp Trp Ser  
 1385 1390 1395

Asp Glu Lys Asp Cys Gly Asp Ser His Ile Leu Pro Phe Ser Thr  
 1400 1405 1410

Pro Gly Pro Ser Thr Cys Leu Pro Asn Tyr Tyr Arg Cys Ser Ser  
 1415 1420 1425

Gly Thr Cys Val Met Asp Thr Trp Val Cys Asp Gly Tyr Arg Asp  
 1430 1435 1440

Cys Ala Asp Gly Ser Asp Glu Glu Ala Cys Pro Leu Leu Ala Asn  
 1445 1450 1455

Val Thr Ala Ala Ser Thr Pro Thr Gln Leu Gly Arg Cys Asp Arg  
 1460 1465 1470

Phe Glu Phe Glu Cys His Gln Pro Lys Thr Cys Ile Pro Asn Trp  
 1475 1480 1485

Lys Arg Cys Asp Gly His Gln Asp Cys Gln Asp Gly Arg Asp Glu  
 1490 1495 1500

Ala Asn Cys Pro Thr His Ser Thr Leu Thr Cys Met Ser Arg Glu  
 1505 1510 1515

Phe Gln Cys Glu Asp Gly Glu Ala Cys Ile Val Leu Ser Glu Arg  
 1520 1525 1530

Cys Asp Gly Phe Leu Asp Cys Ser Asp Glu Ser Asp Glu Lys Ala  
 1535 1540 1545

Cys Ser Asp Glu Leu Thr Val Tyr Lys Val Gln Asn Leu Gln Trp  
 1550 1555 1560

Thr Ala Asp Phe Ser Gly Asp Val Thr Leu Thr Trp Met Arg Pro  
 1565 1570 1575

Lys Lys Met Pro Ser Ala Ser Cys Val Tyr Asn Val Tyr Tyr Arg  
 1580 1585 1590

Val Val Gly Glu Ser Ile Trp Lys Thr Leu Glu Thr His Ser Asn  
 1595 1600 1605

ES 2 464 459 T3

Lys Thr Asn Thr Val Leu Lys Val Leu Lys Pro Asp Thr Thr Tyr  
 1610 1615 1620  
 Gln Val Lys Val Gln Val Gln Cys Leu Ser Lys Ala His Asn Thr  
 1625 1630 1635  
 Asn Asp Phe Val Thr Leu Arg Thr Pro Glu Gly Leu Pro Asp Ala  
 1640 1645 1650  
 Pro Arg Asn Leu Gln Leu Ser Leu Pro Arg Glu Ala Glu Gly Val  
 1655 1660 1665  
 Ile Val Gly His Trp Ala Pro Pro Ile His Thr His Gly Leu Ile  
 1670 1675 1680  
 Arg Glu Tyr Ile Val Glu Tyr Ser Arg Ser Gly Ser Lys Met Trp  
 1685 1690 1695  
 Ala Ser Gln Arg Ala Ala Ser Asn Phe Thr Glu Ile Lys Asn Leu  
 1700 1705 1710  
 Leu Val Asn Thr Leu Tyr Thr Val Arg Val Ala Ala Val Thr Ser  
 1715 1720 1725  
 Arg Gly Ile Gly Asn Trp Ser Asp Ser Lys Ser Ile Thr Thr Ile  
 1730 1735 1740  
 Lys Gly Lys Val Ile Pro Pro Pro Asp Ile His Ile Asp Ser Tyr  
 1745 1750 1755  
 Gly Glu Asn Tyr Leu Ser Phe Thr Leu Thr Met Glu Ser Asp Ile  
 1760 1765 1770  
 Lys Val Asn Gly Tyr Val Val Asn Leu Phe Trp Ala Phe Asp Thr  
 1775 1780 1785  
 His Lys Gln Glu Arg Arg Thr Leu Asn Phe Arg Gly Ser Ile Leu  
 1790 1795 1800  
 Ser His Lys Val Gly Asn Leu Thr Ala His Thr Ser Tyr Glu Ile  
 1805 1810 1815  
 Ser Ala Trp Ala Lys Thr Asp Leu Gly Asp Ser Pro Leu Ala Phe  
 1820 1825 1830  
 Glu His Val Met Thr Arg Gly Val Arg Pro Pro Ala Pro Ser Leu  
 1835 1840 1845  
 Lys Ala Lys Ala Ile Asn Gln Thr Ala Val Glu Cys Thr Trp Thr  
 1850 1855 1860  
 Gly Pro Arg Asn Val Val Tyr Gly Ile Phe Tyr Ala Thr Ser Phe

ES 2 464 459 T3

1865                                      1870                                      1875  
 Leu Asp    Leu Tyr Arg Asn Pro    Lys Ser Leu Thr Thr    Ser Leu His  
   1880                                      1885                                      1890  
 Asn Lys    Thr Val Ile Val Ser    Lys Asp Glu Gln Tyr    Leu Phe Leu  
   1895                                      1900                                      1905  
 Val Arg    Val Val Val Pro Tyr    Gln Gly Pro Ser Ser    Asp Tyr Val  
   1910                                      1915                                      1920  
 Val Val    Lys Met Ile Pro Asp    Ser Arg Leu Pro Pro    Arg His Leu  
   1925                                      1930                                      1935  
 His Val    Val His Thr Gly Lys    Thr Ser Val Val Ile    Lys Trp Glu  
   1940                                      1945                                      1950  
 Ser Pro    Tyr Asp Ser Pro Asp    Gln Asp Leu Leu Tyr    Ala Ile Ala  
   1955                                      1960                                      1965  
 Val Lys    Asp Leu Ile Arg Lys    Thr Asp Arg Ser Tyr    Lys Val Lys  
   1970                                      1975                                      1980  
 Ser Arg    Asn Ser Thr Val Glu    Tyr Thr Leu Asn Lys    Leu Glu Pro  
   1985                                      1990                                      1995  
 Gly Gly    Lys Tyr His Ile Ile    Val Gln Leu Gly Asn    Met Ser Lys  
   2000                                      2005                                      2010  
 Asp Ser    Ser Ile Lys Ile Thr    Thr Val Ser Leu Ser    Ala Pro Asp  
   2015                                      2020                                      2025  
 Ala Leu    Lys Ile Ile Thr Glu    Asn Asp His Val Leu    Leu Phe Trp  
   2030                                      2035                                      2040  
 Lys Ser    Leu Ala Leu Lys Glu    Lys His Phe Asn Glu    Ser Arg Gly  
   2045                                      2050                                      2055  
 Tyr Glu    Ile His Met Phe Asp    Ser Ala Met Asn Ile    Thr Ala Tyr  
   2060                                      2065                                      2070  
 Leu Gly    Asn Thr Thr Asp Asn    Phe Phe Lys Ile Ser    Asn Leu Lys  
   2075                                      2080                                      2085  
 Met Gly    His Asn Tyr Thr Phe    Thr Val Gln Ala Arg    Cys Leu Phe  
   2090                                      2095                                      2100  
 Gly Asn    Gln Ile Cys Gly Glu    Pro Ala Ile Leu Leu    Tyr Asp Glu  
   2105                                      2110                                      2115  
 Leu Gly    Ser Gly Ala Asp Ala    Ser Ala Thr Gln Ala    Ala Arg Ser  
   2120                                      2125                                      2130

ES 2 464 459 T3

Thr Asp Val Ala Ala Val Val Val Pro Ile Leu Phe Leu Ile Leu  
 2135 2140 2145

Leu Ser Leu Gly Val Gly Phe Ala Ile Leu Tyr Thr Lys His Arg  
 2150 2155 2160

Arg Leu Gln Ser Ser Phe Thr Ala Phe Ala Asn Ser His Tyr Ser  
 2165 2170 2175

Ser Arg Leu Gly Ser Ala Ile Phe Ser Ser Gly Asp Asp Leu Gly  
 2180 2185 2190

Glu Asp Asp Glu Asp Ala Pro Met Ile Thr Gly Phe Ser Asp Asp  
 2195 2200 2205

Val Pro Met Val Ile Ala  
 2210

<210> 3  
 <211> 1168  
 5 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 10 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA  
 <222> (1)..(1168)  
 <223> SorCS1

<400> 3  
 Met Gly Lys Val Gly Ala Gly Gly Gly Ser Gln Ala Arg Leu Ser Ala  
 1 5 10 15

Leu Leu Ala Gly Ala Gly Leu Leu Ile Leu Cys Ala Pro Gly Val Cys  
 20 25 30

Gly Gly Gly Ser Cys Cys Pro Ser Pro His Pro Ser Ser Ala Pro Arg  
 35 40 45

Ser Ala Ser Thr Pro Arg Gly Phe Ser His Gln Gly Arg Pro Gly Arg  
 50 55 60

Ala Pro Ala Thr Pro Leu Pro Leu Val Val Arg Pro Leu Phe Ser Val  
 65 70 75 80

Ala Pro Gly Asp Arg Ala Leu Ser Leu Glu Arg Ala Arg Gly Thr Gly  
 85 90 95

Ala Ser Met Ala Val Ala Ala Arg Ser Gly Arg Arg Arg Arg Ser Gly  
 100 105 110

Ala Asp Gln Glu Lys Ala Glu Arg Gly Glu Gly Ala Ser Arg Ser Pro  
 115 120 125

ES 2 464 459 T3

Arg Gly Val Leu Arg Asp Gly Gly Gln Gln Glu Pro Gly Thr Arg Glu  
 130 135 140  
 Arg Asp Pro Asp Lys Ala Thr Arg Phe Arg Met Glu Glu Leu Arg Leu  
 145 150 155 160  
 Thr Ser Thr Thr Phe Ala Leu Thr Gly Asp Ser Ala His Asn Gln Ala  
 165 170 175  
 Met Val His Trp Ser Gly His Asn Ser Ser Val Ile Leu Ile Leu Thr  
 180 185 190  
 Lys Leu Tyr Asp Tyr Asn Leu Gly Ser Ile Thr Glu Ser Ser Leu Trp  
 195 200 205  
 Arg Ser Thr Asp Tyr Gly Thr Thr Tyr Glu Lys Leu Asn Asp Lys Val  
 210 215 220  
 Gly Leu Lys Thr Ile Leu Gly Tyr Leu Tyr Val Cys Pro Thr Asn Lys  
 225 230 235 240  
 Arg Lys Ile Met Leu Leu Thr Asp Pro Glu Ile Glu Ser Ser Leu Leu  
 245 250 255  
 Ile Ser Ser Asp Glu Gly Ala Thr Tyr Gln Lys Tyr Arg Leu Asn Phe  
 260 265 270  
 Tyr Ile Gln Ser Leu Leu Phe His Pro Lys Gln Glu Asp Trp Ile Leu  
 275 280 285  
 Ala Tyr Ser Gln Asp Gln Lys Leu Tyr Ser Ser Ala Glu Phe Gly Arg  
 290 295 300  
 Arg Trp Gln Leu Ile Gln Glu Gly Val Val Pro Asn Arg Phe Tyr Trp  
 305 310 315 320  
 Ser Val Met Gly Ser Asn Lys Glu Pro Asp Leu Val His Leu Glu Ala  
 325 330 335  
 Arg Thr Val Asp Gly His Ser His Tyr Leu Thr Cys Arg Met Gln Asn  
 340 345 350  
 Cys Thr Glu Ala Asn Arg Asn Gln Pro Phe Pro Gly Tyr Ile Asp Pro  
 355 360 365  
 Asp Ser Leu Ile Val Gln Asp His Tyr Val Phe Val Gln Leu Thr Ser  
 370 375 380  
 Gly Gly Arg Pro His Tyr Tyr Val Ser Tyr Arg Arg Asn Ala Phe Ala  
 385 390 395 400

ES 2 464 459 T3

Gln Met Lys Leu Pro Lys Tyr Ala Leu Pro Lys Asp Met His Val Ile  
405 410 415

Ser Thr Asp Glu Asn Gln Val Phe Ala Ala Val Gln Glu Trp Asn Gln  
420 425 430

Asn Asp Thr Tyr Asn Leu Tyr Ile Ser Asp Thr Arg Gly Val Tyr Phe  
435 440 445

Thr Leu Ala Leu Glu Asn Val Gln Ser Ser Arg Gly Pro Glu Gly Asn  
450 455 460

Ile Met Ile Asp Leu Tyr Glu Val Ala Gly Ile Lys Gly Met Phe Leu  
465 470 475 480

Ala Asn Lys Lys Ile Asp Tyr Gln Val Lys Thr Phe Ile Thr Tyr Asn  
485 490 495

Lys Gly Arg Asp Trp Arg Leu Leu Gln Ala Pro Asp Thr Asp Leu Arg  
500 510

Gly Asp Pro Val His Cys Leu Leu Pro Tyr Cys Ser Leu His Leu His  
515 520 525

Leu Lys Val Ser Glu Asn Pro Tyr Thr Ser Gly Ile Ile Ala Ser Lys  
530 535

Asp Thr Ala Pro Ser Ile Ile Val Ala Ser Gly Asn Ile Gly Ser Glu  
545 550 555 560

Leu Ser Asp Thr Asp Ile Ser Met Phe Val Ser Ser Asp Ala Gly Asn  
565 570 575

Thr Trp Arg Gln Ile Phe Glu Glu Glu His Ser Val Leu Tyr Leu Asp  
580 585 590

Gln Gly Gly Val Leu Val Ala Met Lys His Thr Ser Leu Pro Ile Arg  
595 600 605

His Leu Trp Leu Ser Phe Asp Glu Gly Arg Ser Trp Ser Lys Tyr Ser  
610 615 620

Phe Thr Ser Ile Pro Leu Phe Val Asp Gly Val Leu Gly Glu Pro Gly  
625 630 635 640

Glu Glu Thr Leu Ile Met Thr Val Phe Gly His Phe Ser His Arg Ser  
645 650 655

Glu Trp Gln Leu Val Lys Val Asp Tyr Lys Ser Ile Phe Asp Arg Arg  
660 665 670

ES 2 464 459 T3

Cys Ala Glu Glu Asp Tyr Arg Pro Trp Gln Leu His Ser Gln Gly Glu  
 675 680 685  
 Ala Cys Ile Met Gly Ala Lys Arg Ile Tyr Lys Lys Arg Lys Ser Glu  
 690 695 700  
 Arg Lys Cys Met Gln Gly Lys Tyr Ala Gly Ala Met Glu Ser Glu Pro  
 705 710 715 720  
 Cys Val Cys Thr Glu Ala Asp Phe Asp Cys Asp Tyr Gly Tyr Glu Arg  
 725 730 735  
 His Ser Asn Gly Gln Cys Leu Pro Ala Phe Trp Phe Asn Pro Ser Ser  
 740 745 750  
 Leu Ser Lys Asp Cys Ser Leu Gly Gln Ser Tyr Leu Asn Ser Thr Gly  
 755 760 765  
 Tyr Arg Lys Val Val Ser Asn Asn Cys Thr Asp Gly Val Arg Glu Gln  
 770 775 780  
 Tyr Thr Ala Lys Pro Gln Lys Cys Pro Gly Lys Ala Pro Arg Gly Leu  
 785 790 795 800  
 Arg Ile Val Thr Ala Asp Gly Lys Leu Thr Ala Glu Gln Gly His Asn  
 805 810 815  
 Val Thr Leu Met Val Gln Leu Glu Glu Gly Asp Val Gln Arg Thr Leu  
 820 825 830  
 Ile Gln Val Asp Phe Gly Asp Gly Ile Ala Val Ser Tyr Val Asn Leu  
 835 840 845  
 Ser Ser Met Glu Asp Gly Ile Lys His Val Tyr Gln Asn Val Gly Ile  
 850 855 860  
 Phe Arg Val Thr Val Gln Val Asp Asn Ser Leu Gly Ser Asp Ser Ala  
 865 870 875 880  
 Val Leu Tyr Leu His Val Thr Cys Pro Leu Glu His Val His Leu Ser  
 885 890 895  
 Leu Pro Phe Val Thr Thr Lys Asn Lys Glu Val Asn Ala Thr Ala Val  
 900 905 910  
 Leu Trp Pro Ser Gln Val Gly Thr Leu Thr Tyr Val Trp Trp Tyr Gly  
 915 920 925  
 Asn Asn Thr Glu Pro Leu Ile Thr Leu Glu Gly Ser Ile Ser Phe Arg  
 930 935 940  
 Phe Thr Ser Glu Gly Met Asn Thr Ile Thr Val Gln Val Ser Ala Gly



ES 2 464 459 T3

<223> SorCS2

<400> 4

Leu Ile Phe His Pro Lys Glu Glu Asp Lys Val Leu Ala Tyr Thr Lys  
 1 5 10 15  
 Glu Ser Lys Leu Tyr Val Ser Ser Asp Leu Gly Lys Lys Trp Thr Leu  
 20 25 30  
 Leu Gln Glu Arg Val Thr Lys Asp His Val Phe Trp Ser Val Ser Gly  
 35 40 45  
 Val Asp Ala Asp Pro Asp Leu Val His Val Glu Ala Gln Asp Leu Gly  
 50 55 60  
 Gly Asp Phe Arg Tyr Val Thr Cys Ala Ile His Asn Cys Ser Glu Lys  
 65 70 75 80  
 Met Leu Thr Ala Pro Phe Ala Gly Pro Ile Asp His Gly Ser Leu Thr  
 85 90 95  
 Val Gln Asp Asp Tyr Ile Phe Phe Lys Ala Thr Ser Ala Asn Gln Thr  
 100 105 110  
 Lys Tyr Tyr Val Ser Tyr Arg Arg Asn Glu Phe Val Leu Met Lys Leu  
 115 120 125  
 Pro Lys Tyr Ala Leu Pro Lys Asp Leu Gln Ile Ile Ser Thr Asp Glu  
 130 135 140  
 Ser Gln Val Phe Val Ala Val Gln Glu Trp Tyr Gln Met Asp Thr Tyr  
 145 150 155 160  
 Asn Leu Tyr Gln Ser Asp Pro Arg Gly Val Arg Tyr Ala Leu Val Leu  
 165 170 175  
 Gln Asp Val Arg Ser Ser Arg Gln Ala Glu Glu Ser Val Leu Ile Asp  
 180 185 190  
 Ile Leu Glu Val Arg Gly Val Lys Gly Val Phe Leu Ala Asn Gln Lys  
 195 200 205  
 Ile Asp Gly Lys Val Met Thr Leu Ile Thr Tyr Asn Lys Gly Arg Asp  
 210 215 220  
 Trp Asp Tyr Leu Arg Pro Pro Ser Met Asp Met Asn Gly Lys Pro Thr  
 225 230 235 240  
 Asn Cys Lys Pro Pro Asp Cys His Leu His Leu His Leu Arg Trp Ala  
 245 250 255  
 Asp Asn Pro Tyr Val Ser Gly Thr Val His Thr Lys Asp Thr Ala Pro  
 260 265 270

ES 2 464 459 T3

Gly Leu Ile Met Gly Ala Gly Asn Leu Gly Ser Gln Leu Val Glu Tyr  
 275 280 285  
 Lys Glu Glu Met Tyr Ile Thr Ser Asp Cys Gly His Thr Trp Arg Gln  
 290 295 300  
 Val Phe Glu Glu Glu His His Ile Leu Tyr Leu Asp His Gly Gly Val  
 305 310 315 320  
 Ile Val Ala Ile Lys Asp Thr Ser Ile Pro Leu Lys Ile Leu Lys Phe  
 325 330 335  
 Ser Val Asp Glu Gly Leu Thr Trp Ser Thr His Asn Phe Thr Ser Thr  
 340 345 350  
 Ser Val Phe Val Asp Gly Leu Leu Ser Glu Pro Gly Asp Glu Thr Leu  
 355 360 365  
 Val Met Thr Val Phe Gly His Ile Ser Phe Arg Ser Asp Trp Glu Leu  
 370 375 380  
 Val Lys Val Asp Phe Arg Pro Ser Phe Ser Arg Gln Cys Gly Glu Glu  
 385 390 395 400  
 Asp Tyr Ser Ser Trp Glu Leu Ser Asn Leu Gln Gly Asp Arg Cys Ile  
 405 410 415  
 Met Gly Gln Gln Arg Ser Phe Arg Lys Arg Lys Ser Thr Ser Trp Cys  
 420 425 430  
 Ile Lys Gly Arg Ser Phe Thr Ser Ala Leu Thr Ser Arg Val Cys Glu  
 435 440 445  
 Cys Arg Asp Ser Asp Phe Leu Cys Asp Tyr Gly Phe Glu Arg Ser Pro  
 450 455 460  
 Ser Ser Glu Ser Ser Thr Asn Lys Cys Ser Ala Asn Phe Trp Phe Asn  
 465 470 475 480  
 Pro Leu Ser Pro Pro Asp Asp Cys Ala Leu Gly Gln Thr Tyr Thr Ser  
 485 490 495  
 Ser Leu Gly Tyr Arg Lys Val Val Ser Asn Val Cys Glu Gly Gly Val  
 500 505 510  
 Asp Met Gln Gln Ser Gln Val Gln Leu Gln Cys Pro Leu Thr Pro Pro  
 515 520 525  
 Arg Gly Leu Gln Val Ser Ile Gln Gly Glu Ala Val Ala Val Arg Pro  
 530 535 540

ES 2 464 459 T3

Gly 545 Glu Asp Val Leu Phe 550 Val Val Arg Gln Glu 555 Gln Gly Asp Val Leu 560

Thr Thr Lys Tyr Gln 565 Val Asp Leu Gly Asp 570 Gly Phe Lys Ala Met 575 Tyr

Val Asn Leu Thr 580 Leu Thr Gly Glu Pro 585 Ile Arg His Arg Tyr 590 Glu Ser

Pro Gly Ile 595 Tyr Arg Val Ser Val 600 Arg Ala Glu Asn Thr 605 Ala Gly His

Asp Glu 610 Ala Val Leu Phe Val 615 Gln Val Asn Ser Pro 620 Leu Gln Ala Leu

Tyr 625 Leu Glu Val Val 630 Pro Val Ile Gly Leu Asn 635 Gln Glu Val Asn 640 Leu

Thr Ala Val Leu 645 Leu Pro Leu Asn Pro Asn 650 Leu Thr Val Phe Tyr Trp 655

Trp Ile Gly His 660 Ser Leu Gln Pro Leu 665 Leu Ser Leu Asp Asn 670 Ser Val

Thr Thr Arg 675 Phe Ser Asp Thr Gly 680 Asp Val Arg Val Thr 685 Val Gln Ala

Ala Cys 690 Gly Asn Ser Val 695 Leu Gln Asp Ser Arg Val 700 Leu Arg Val Leu

Asp 705 Gln Phe Gln Val Met 710 Pro Leu Gln Phe Ser 715 Lys Glu Leu Asp Ala 720

Tyr Asn Pro Asn Thr 725 Pro Glu Trp Arg Glu 730 Asp Val Gly Leu Val 735 Val

Thr Arg Leu 740 Leu Ser Lys Glu Thr Ser 745 Val Pro Gln Glu Leu 750 Leu Val

Thr Val 755 Val Lys Pro Gly Leu Pro 760 Thr Leu Ala Asp Leu 765 Tyr Val Leu

Leu Pro 770 Pro Pro Arg Pro Thr 775 Arg Lys Arg Ser Leu 780 Ser Ser Asp Lys

Arg 785 Leu Ala Ala Ile Gln 790 Gln Val Leu Asn Ala 795 Gln Lys Ile Ser Phe 800

Leu Leu Arg Gly 805 Gly Val Arg Val Leu Val 810 Ala Leu Arg Asp Thr 815 Gly

ES 2 464 459 T3

Thr Gly Ala Glu Gln Leu Gly Gly Gly Gly Tyr Trp Ala Val Val  
 820 825 830

Val Leu Phe Val Ile Gly Leu Phe Ala Ala Gly Ala Phe Ile Leu Tyr  
 835 840 845

Lys Phe Lys Arg Lys Arg Pro Gly Arg Thr Val Tyr Ala Gln Met His  
 850 855 860

Asn Glu Lys Glu Gln Glu Met Thr Ser Pro Val Ser His Ser Glu Asp  
 865 870 875 880

Val Gln Gly Ala Val Gln Gly Asn His Ser Gly Val Val Leu Ser Ile  
 885 890 895

Asn Ser Arg Glu Met His Ser Tyr Leu Val Ser  
 900 905

<210> 5  
 <211> 1222  
 5 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 10 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA  
 <222> (1)..(1222)  
 <223> SorCS3

<400> 5  
 Met Glu Ala Ala Arg Thr Glu Arg Pro Ala Gly Arg Pro Gly Ala Pro  
 1 5 10 15

Leu Val Arg Thr Gly Leu Leu Leu Leu Ser Thr Trp Val Leu Ala Gly  
 20 25 30

Ala Glu Ile Thr Trp Asp Ala Thr Gly Gly Pro Gly Arg Pro Ala Ala  
 35 40 45

Pro Ala Ser Arg Pro Pro Ala Leu Ser Pro Leu Ser Pro Arg Ala Val  
 50 55 60

Ala Ser Gln Trp Pro Glu Glu Leu Ala Ser Ala Arg Arg Ala Ala Val  
 65 70 75 80

Leu Gly Arg Arg Ala Gly Pro Glu Leu Leu Pro Gln Gln Gly Gly Gly  
 85 90 95

Arg Gly Gly Glu Met Gln Val Glu Ala Gly Gly Thr Ser Pro Ala Gly  
 100 105 110

Glu Arg Arg Gly Arg Gly Ile Pro Ala Pro Ala Lys Leu Gly Gly Ala  
 115 120 125

ES 2 464 459 T3

Arg Arg Ser Arg Arg Ala Gln Pro Pro Ile Thr Gln Glu Arg Gly Asp  
 130 135 140  
 Ala Trp Ala Thr Ala Pro Ala Asp Gly Ser Arg Gly Ser Arg Pro Leu  
 145 150 155 160  
 Ala Lys Gly Ser Arg Glu Glu Val Lys Ala Pro Arg Ala Gly Gly Ser  
 165 170 175  
 Ala Ala Glu Asp Leu Arg Leu Pro Ser Thr Ser Phe Ala Leu Thr Gly  
 180 185 190  
 Asp Ser Ala His Asn Gln Ala Met Val His Trp Ser Gly His Asn Ser  
 195 200 205  
 Ser Val Ile Leu Ile Leu Thr Lys Leu Tyr Asp Phe Asn Leu Gly Ser  
 210 215 220  
 Val Thr Glu Ser Ser Leu Trp Arg Ser Thr Asp Tyr Gly Thr Thr Tyr  
 225 230 235 240  
 Glu Lys Leu Asn Asp Lys Val Gly Leu Lys Thr Val Leu Ser Tyr Leu  
 245 250 255  
 Tyr Val Asn Pro Thr Asn Lys Arg Lys Ile Met Leu Leu Ser Asp Pro  
 260 265 270  
 Glu Met Glu Ser Ser Ile Leu Ile Ser Ser Asp Glu Gly Ala Thr Tyr  
 275 280 285  
 Gln Lys Tyr Arg Leu Thr Phe Tyr Ile Gln Ser Leu Leu Phe His Pro  
 290 295 300  
 Lys Gln Glu Asp Trp Val Leu Ala Tyr Ser Leu Asp Gln Lys Leu Tyr  
 305 310 315 320  
 Ser Ser Met Asp Phe Gly Arg Arg Trp Gln Leu Met His Glu Arg Ile  
 325 330 335  
 Thr Pro Asn Arg Phe Tyr Trp Ser Val Ala Gly Leu Asp Lys Glu Ala  
 340 345 350  
 Asp Leu Val His Met Glu Val Arg Thr Thr Asp Gly Tyr Ala His Tyr  
 355 360 365  
 Leu Thr Cys Arg Ile Gln Glu Cys Ala Glu Thr Thr Arg Ser Gly Pro  
 370 375 380  
 Phe Ala Arg Ser Ile Asp Ile Ser Ser Leu Val Val Gln Asp Glu Tyr  
 385 390 395 400  
 Ile Phe Ile Gln Val Thr Thr Ser Gly Arg Ala Ser Tyr Tyr Val Ser



ES 2 464 459 T3

Lys Ser Ile Phe Ser Arg His Cys Thr Lys Glu Asp Tyr Gln Thr Trp  
 690 695 700  
 His Leu Leu Asn Gln Gly Glu Pro Cys Val Met Gly Glu Arg Lys Ile  
 705 710 715  
 Phe Lys Lys Arg Lys Pro Gly Ala Gln Cys Ala Leu Gly Arg Asp His  
 725 730 735  
 Ser Gly Ser Val Val Ser Glu Pro Cys Val Cys Ala Asn Trp Asp Phe  
 740 745 750  
 Glu Cys Asp Tyr Gly Tyr Glu Arg His Gly Glu Ser Gln Cys Val Pro  
 755 760 765  
 Ala Phe Trp Tyr Asn Pro Ala Ser Pro Ser Lys Asp Cys Ser Leu Gly  
 770 775 780  
 Gln Ser Tyr Leu Asn Ser Thr Gly Tyr Arg Arg Ile Val Ser Asn Asn  
 785 790 795 800  
 Cys Thr Asp Gly Leu Arg Glu Lys Tyr Thr Ala Lys Ala Gln Met Cys  
 805 810 815  
 Pro Gly Lys Ala Pro Arg Gly Leu His Val Val Thr Thr Asp Gly Arg  
 820 825 830  
 Leu Val Ala Glu Gln Gly His Asn Ala Thr Phe Ile Ile Leu Met Glu  
 835 840 845  
 Glu Gly Asp Leu Gln Arg Thr Asn Ile Gln Leu Asp Phe Gly Asp Gly  
 850 855 860  
 Ile Ala Val Ser Tyr Ala Asn Phe Ser Pro Ile Glu Asp Gly Ile Lys  
 865 870 875 880  
 His Val Tyr Lys Ser Ala Gly Ile Phe Gln Val Thr Ala Tyr Ala Glu  
 885 890 895  
 Asn Asn Leu Gly Ser Asp Thr Ala Val Leu Phe Leu His Val Val Cys  
 900 905 910  
 Pro Val Glu His Val His Leu Arg Val Pro Phe Val Ala Ile Arg Asn  
 915 920 925  
 Lys Glu Val Asn Ile Ser Ala Val Val Trp Pro Ser Gln Leu Gly Thr  
 930 935 940  
 Leu Thr Tyr Phe Trp Trp Phe Gly Asn Ser Thr Lys Pro Leu Ile Thr  
 945 950 955 960

ES 2 464 459 T3

Leu Asp Ser Ser Ile Ser Phe Thr Phe Leu Ala Glu Gly Thr Asp Thr  
 965 970 975  
 Ile Thr Val Gln Val Ala Ala Gly Asn Ala Leu Ile Gln Asp Thr Lys  
 980 985 990  
 Glu Ile Ala Val His Glu Tyr Phe Gln Ser Gln Leu Leu Ser Phe Ser  
 995 1000 1005  
 Pro Asn Leu Asp Tyr His Asn Pro Asp Ile Pro Glu Trp Arg Lys  
 1010 1015 1020  
 Asp Ile Gly Asn Val Ile Lys Arg Ala Leu Val Lys Val Thr Ser  
 1025 1030 1035  
 Val Pro Glu Asp Gln Ile Leu Ile Ala Val Phe Pro Gly Leu Pro  
 1040 1045 1050  
 Thr Ser Ala Glu Leu Phe Ile Leu Pro Pro Lys Asn Leu Thr Glu  
 1055 1060 1065  
 Arg Arg Lys Gly Asn Glu Gly Asp Leu Glu Gln Ile Val Glu Thr  
 1070 1075 1080  
 Leu Phe Asn Ala Leu Asn Gln Asn Leu Val Gln Phe Glu Leu Lys  
 1085 1090 1095  
 Pro Gly Val Gln Val Ile Val Tyr Val Thr Gln Leu Thr Leu Ala  
 1100 1105 1110  
 Pro Leu Val Asp Ser Ser Ala Gly His Ser Ser Ser Ala Met Leu  
 1115 1120 1125  
 Met Leu Leu Ser Val Val Phe Val Gly Leu Ala Val Phe Leu Ile  
 1130 1135 1140  
 Tyr Lys Phe Lys Arg Lys Ile Pro Trp Ile Asn Ile Tyr Ala Gln  
 1145 1150 1155  
 Val Gln His Asp Lys Glu Gln Glu Met Ile Gly Ser Val Ser Gln  
 1160 1165 1170  
 Ser Glu Asn Ala Pro Lys Ile Thr Leu Ser Asp Phe Thr Glu Pro  
 1175 1180 1185  
 Glu Glu Leu Leu Asp Lys Glu Leu Asp Thr Arg Val Ile Gly Gly  
 1190 1195 1200  
 Ile Ala Thr Ile Ala Asn Ser Glu Ser Thr Lys Glu Ile Pro Asn  
 1205 1210 1215

Cys Thr Ser Val  
1220

5 <210> 6  
<211> 839  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

10 <220>  
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA  
<222> (1)..(839)  
<223> TrpV1

<400> 6  
Met Lys Lys Trp Ser Ser Thr Asp Leu Gly Ala Ala Ala Asp Pro Leu  
1 5 10 15

Gln Lys Asp Thr Cys Pro Asp Pro Leu Asp Gly Asp Pro Asn Ser Arg  
20 25 30

Pro Pro Pro Ala Lys Pro Gln Leu Ser Thr Ala Lys Ser Arg Thr Arg  
35 40 45

Leu Phe Gly Lys Gly Asp Ser Glu Glu Ala Phe Pro Val Asp Cys Pro  
50 55 60

His Glu Glu Gly Glu Leu Asp Ser Cys Pro Thr Ile Thr Val Ser Pro  
65 70 75 80

Val Ile Thr Ile Gln Arg Pro Gly Asp Gly Pro Thr Gly Ala Arg Leu  
85 90 95

Leu Ser Gln Asp Ser Val Ala Ala Ser Thr Glu Lys Thr Leu Arg Leu  
100 105 110

Tyr Asp Arg Arg Ser Ile Phe Glu Ala Val Ala Gln Asn Asn Cys Gln  
115 120 125

Asp Leu Glu Ser Leu Leu Leu Phe Leu Gln Lys Ser Lys Lys His Leu  
130 135 140

Thr Asp Asn Glu Phe Lys Asp Pro Glu Thr Gly Lys Thr Cys Leu Leu  
145 150 155 160

Lys Ala Met Leu Asn Leu His Asp Gly Gln Asn Thr Thr Ile Pro Leu  
165 170 175

Leu Leu Glu Ile Ala Arg Gln Thr Asp Ser Leu Lys Glu Leu Val Asn  
180 185 190

15 Ala Ser Tyr Thr Asp Ser Tyr Tyr Lys Gly Gln Thr Ala Leu His Ile  
195 200 205

ES 2 464 459 T3

Ala Ile Glu Arg Arg Asn Met Ala Leu Val Thr Leu Leu Val Glu Asn  
 210 215 220

Gly Ala Asp Val Gln Ala Ala Ala His Gly Asp Phe Phe Lys Lys Thr  
 225 230 235 240

Lys Gly Arg Pro Gly Phe Tyr Phe Gly Glu Leu Pro Leu Ser Leu Ala  
 245 250 255

Ala Cys Thr Asn Gln Leu Gly Ile Val Lys Phe Leu Leu Gln Asn Ser  
 260 265 270

Trp Gln Thr Ala Asp Ile Ser Ala Arg Asp Ser Val Gly Asn Thr Val  
 275 280 285

Leu His Ala Leu Val Glu Val Ala Asp Asn Thr Ala Asp Asn Thr Lys  
 290 295 300

Phe Val Thr Ser Met Tyr Asn Glu Ile Leu Ile Leu Gly Ala Lys Leu  
 305 310 315 320

His Pro Thr Leu Lys Leu Glu Glu Leu Thr Asn Lys Lys Gly Met Thr  
 325 330 335

Pro Leu Ala Leu Ala Ala Gly Thr Gly Lys Ile Gly Val Leu Ala Tyr  
 340 345 350

Ile Leu Gln Arg Glu Ile Gln Glu Pro Glu Cys Arg His Leu Ser Arg  
 355 360 365

Lys Phe Thr Glu Trp Ala Tyr Gly Pro Val His Ser Ser Leu Tyr Asp  
 370 375 380

Leu Ser Cys Ile Asp Thr Cys Glu Lys Asn Ser Val Leu Glu Val Ile  
 385 390 395 400

Ala Tyr Ser Ser Ser Glu Thr Pro Asn Arg His Asp Met Leu Leu Val  
 405 410 415

Glu Pro Leu Asn Arg Leu Leu Gln Asp Lys Trp Asp Arg Phe Val Lys  
 420 425 430

Arg Ile Phe Tyr Phe Asn Phe Leu Val Tyr Cys Leu Tyr Met Ile Ile  
 435 440 445

Phe Thr Met Ala Ala Tyr Tyr Arg Pro Val Asp Gly Leu Pro Pro Phe  
 450 455 460

Lys Met Glu Lys Thr Gly Asp Tyr Phe Arg Val Thr Gly Glu Ile Leu  
 465 470 475 480

Ser Val Leu Gly Gly Val Tyr Phe Phe Phe Arg Gly Ile Gln Tyr Phe



Gly Val Lys Arg Thr Leu Ser Phe Ser Leu Arg Ser Ser Arg Val Ser  
770 775 780

Gly Arg His Trp Lys Asn Phe Ala Leu Val Pro Leu Leu Arg Glu Ala  
785 790 795 800

Ser Ala Arg Asp Arg Gln Ser Ala Gln Pro Glu Glu Val Tyr Leu Arg  
805 810 815

Gln Phe Ser Gly Ser Leu Lys Pro Glu Asp Ala Glu Val Phe Lys Ser  
820 825 830

Pro Ala Ala Ser Gly Glu Lys  
835

<210> 7  
<211> 764  
5 <212> PRT  
<213> Homo sapiens

<220>  
10 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA  
<222> (1)..(764)  
<223> TrpV2

<400> 7  
Met Thr Ser Pro Ser Ser Ser Pro Val Phe Arg Leu Glu Thr Leu Asp  
1 5 10 15

Gly Gly Gln Glu Asp Gly Ser Glu Ala Asp Arg Gly Lys Leu Asp Phe  
20 25 30

Gly Ser Gly Leu Pro Pro Met Glu Ser Gln Phe Gln Gly Glu Asp Arg  
35 40 45

Lys Phe Ala Pro Gln Ile Arg Val Asn Leu Asn Tyr Arg Lys Gly Thr  
50 55 60

Gly Ala Ser Gln Pro Asp Pro Asn Arg Phe Asp Arg Asp Arg Leu Phe  
65 70 75 80

Asn Ala Val Ser Arg Gly Val Pro Glu Asp Leu Ala Gly Leu Pro Glu  
85 90 95

Tyr Leu Ser Lys Thr Ser Lys Tyr Leu Thr Asp Ser Glu Tyr Thr Glu  
100 105 110

Gly Ser Thr Gly Lys Thr Cys Leu Met Lys Ala Val Leu Asn Leu Lys  
115 120 125

Asp Gly Val Asn Ala Cys Ile Leu Pro Leu Leu Gln Ile Asp Arg Asp  
130 135 140

ES 2 464 459 T3

Ser Gly Asn Pro Gln Pro Leu Val Asn Ala Gln Cys Thr Asp Asp Tyr  
 145 150 155 160  
 Tyr Arg Gly His Ser Ala Leu His Ile Ala Ile Glu Lys Arg Ser Leu  
 165 170 175  
 Gln Cys Val Lys Leu Leu Val Glu Asn Gly Ala Asn Val His Ala Arg  
 180 185 190  
 Ala Cys Gly Arg Phe Phe Gln Lys Gly Gln Gly Thr Cys Phe Tyr Phe  
 195 200 205  
 Gly Glu Leu Pro Leu Ser Leu Ala Ala Cys Thr Lys Gln Trp Asp Val  
 210 215 220  
 Val Ser Tyr Leu Leu Glu Asn Pro His Gln Pro Ala Ser Leu Gln Ala  
 225 230 235 240  
 Thr Asp Ser Gln Gly Asn Thr Val Leu His Ala Leu Val Met Ile Ser  
 245 250 255  
 Asp Asn Ser Ala Glu Asn Ile Ala Leu Val Thr Ser Met Tyr Asp Gly  
 260 265 270  
 Leu Leu Gln Ala Gly Ala Arg Leu Cys Pro Thr Val Gln Leu Glu Asp  
 275 280 285  
 Ile Arg Asn Leu Gln Asp Leu Thr Pro Leu Lys Leu Ala Ala Lys Glu  
 290 295 300  
 Gly Lys Ile Glu Ile Phe Arg His Ile Leu Gln Arg Glu Phe Ser Gly  
 305 310 315 320  
 Leu Ser His Leu Ser Arg Lys Phe Thr Glu Trp Cys Tyr Gly Pro Val  
 325 330 335  
 Arg Val Ser Leu Tyr Asp Leu Ala Ser Val Asp Ser Cys Glu Glu Asn  
 340 345 350  
 Ser Val Leu Glu Ile Ile Ala Phe His Cys Lys Ser Pro His Arg His  
 355 360 365  
 Arg Met Val Val Leu Glu Pro Leu Asn Lys Leu Leu Gln Ala Lys Trp  
 370 375 380  
 Asp Leu Leu Ile Pro Lys Phe Phe Leu Asn Phe Leu Cys Asn Leu Ile  
 385 390 395 400  
 Tyr Met Phe Ile Phe Thr Ala Val Ala Tyr His Gln Pro Thr Leu Lys  
 405 410 415

ES 2 464 459 T3

Lys Gln Ala Ala Pro His Leu Lys Ala Glu Val Gly Asn Ser Met Leu  
 420 425 430  
 Leu Thr Gly His Ile Leu Ile Leu Leu Gly Gly Ile Tyr Leu Leu Val  
 435 440 445  
 Gly Gln Leu Trp Tyr Phe Trp Arg Arg His Val Phe Ile Trp Ile Ser  
 450 455 460  
 Phe Ile Asp Ser Tyr Phe Glu Ile Leu Phe Leu Phe Gln Ala Leu Leu  
 465 470 475 480  
 Thr Val Val Ser Gln Val Leu Cys Phe Leu Ala Ile Glu Trp Tyr Leu  
 485 490 495  
 Pro Leu Leu Val Ser Ala Leu Val Leu Gly Trp Leu Asn Leu Leu Tyr  
 500 505 510  
 Tyr Thr Arg Gly Phe Gln His Thr Gly Ile Tyr Ser Val Met Ile Gln  
 515 520 525  
 Lys Val Ile Leu Arg Asp Leu Leu Arg Phe Leu Leu Ile Tyr Leu Val  
 530 535 540  
 Phe Leu Phe Gly Phe Ala Val Ala Leu Val Ser Leu Ser Gln Glu Ala  
 545 550 555 560  
 Trp Arg Pro Glu Ala Pro Thr Gly Pro Asn Ala Thr Glu Ser Val Gln  
 565 570 575  
 Pro Met Glu Gly Gln Glu Asp Glu Gly Asn Gly Ala Gln Tyr Arg Gly  
 580 585 590  
 Ile Leu Glu Ala Ser Leu Glu Leu Phe Lys Phe Thr Ile Gly Met Gly  
 595 600 605  
 Glu Leu Ala Phe Gln Glu Gln Leu His Phe Arg Gly Met Val Leu Leu  
 610 615 620  
 Leu Leu Leu Ala Tyr Val Leu Leu Thr Tyr Ile Leu Leu Leu Asn Met  
 625 630 635 640  
 Leu Ile Ala Leu Met Ser Glu Thr Val Asn Ser Val Ala Thr Asp Ser  
 645 650 655  
 Trp Ser Ile Trp Lys Leu Gln Lys Ala Ile Ser Val Leu Glu Met Glu  
 660 665 670  
 Asn Gly Tyr Trp Trp Cys Arg Lys Lys Gln Arg Ala Gly Val Met Leu  
 675 680 685

ES 2 464 459 T3

Thr Val Gly Thr Lys Pro Asp Gly Ser Pro Asp Glu Arg Trp Cys Phe  
690 695 700

Arg Val Glu Glu Val Asn Trp Ala Ser Trp Glu Gln Thr Leu Pro Thr  
705 710 715 720

Leu Cys Glu Asp Pro Ser Gly Ala Gly Val Pro Arg Thr Leu Glu Asn  
725 730 735

Pro Val Leu Ala Ser Pro Pro Lys Glu Asp Glu Asp Gly Ala Ser Glu  
740 745 750

Glu Asn Tyr Val Pro Val Gln Leu Leu Gln Ser Asn  
755 760

<210> 8  
<211> 790  
5 <212> PRT  
<213> Homo sapiens

<220>  
10 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA  
<222> (1)..(790)  
<223> TrpV3

<400> 8  
Met Lys Ala His Pro Lys Glu Met Val Pro Leu Met Gly Lys Arg Val  
1 5 10 15

Ala Ala Pro Ser Gly Asn Pro Ala Ile Leu Pro Glu Lys Arg Pro Ala  
20 25 30

Glu Ile Thr Pro Thr Lys Lys Ser Ala His Phe Phe Leu Glu Ile Glu  
35 40 45

Gly Phe Glu Pro Asn Pro Thr Val Ala Lys Thr Ser Pro Pro Val Phe  
50 55 60

Ser Lys Pro Met Asp Ser Asn Ile Arg Gln Cys Ile Ser Gly Asn Cys  
65 70 75 80

Asp Asp Met Asp Ser Pro Gln Ser Pro Gln Asp Asp Val Thr Glu Thr  
85 90 95

Pro Ser Asn Pro Asn Ser Pro Ser Ala Gln Leu Ala Lys Glu Glu Gln  
100 105 110

Arg Arg Lys Lys Arg Arg Leu Lys Lys Arg Ile Phe Ala Ala Val Ser  
115 120 125

Glu Gly Cys Val Glu Glu Leu Val Glu Leu Leu Val Glu Leu Gln Glu  
130 135 140

15

ES 2 464 459 T3

Leu Cys Arg Arg Arg His Asp Glu Asp Val Pro Asp Phe Leu Met His  
 145 150 155 160  
 Lys Leu Thr Ala Ser Asp Thr Gly Lys Thr Cys Leu Met Lys Ala Leu  
 165 170 175  
 Leu Asn Ile Asn Pro Asn Thr Lys Glu Ile Val Arg Ile Leu Leu Ala  
 180 185 190  
 Phe Ala Glu Glu Asn Asp Ile Leu Gly Arg Phe Ile Asn Ala Glu Tyr  
 195 200 205  
 Thr Glu Glu Ala Tyr Glu Gly Gln Thr Ala Leu Asn Ile Ala Ile Glu  
 210 215 220  
 Arg Arg Gln Gly Asp Ile Ala Ala Leu Leu Ile Ala Ala Gly Ala Asp  
 225 230 235 240  
 Val Asn Ala His Ala Lys Gly Ala Phe Phe Asn Pro Lys Tyr Gln His  
 245 250 255  
 Glu Gly Phe Tyr Phe Gly Glu Thr Pro Leu Ala Leu Ala Ala Cys Thr  
 260 265 270  
 Asn Gln Pro Glu Ile Val Gln Leu Leu Met Glu His Glu Gln Thr Asp  
 275 280 285  
 Ile Thr Ser Arg Asp Ser Arg Gly Asn Asn Ile Leu His Ala Leu Val  
 290 295 300  
 Thr Val Ala Glu Asp Phe Lys Thr Gln Asn Asp Phe Val Lys Arg Met  
 305 310 315 320  
 Tyr Asp Met Ile Leu Leu Arg Ser Gly Asn Trp Glu Leu Glu Thr Thr  
 325 330 335  
 Arg Asn Asn Asp Gly Leu Thr Pro Leu Gln Leu Ala Ala Lys Met Gly  
 340 345 350  
 Lys Ala Glu Ile Leu Lys Tyr Ile Leu Ser Arg Glu Ile Lys Glu Lys  
 355 360 365  
 Arg Leu Arg Ser Leu Ser Arg Lys Phe Thr Asp Trp Ala Tyr Gly Pro  
 370 375 380  
 Val Ser Ser Ser Leu Tyr Asp Leu Thr Asn Val Asp Thr Thr Thr Asp  
 385 390 395 400  
 Asn Ser Val Leu Glu Ile Thr Val Tyr Asn Thr Asn Ile Asp Asn Arg  
 405 410 415



ES 2 464 459 T3

Lys Met Leu Pro Glu Trp Leu Arg Ser Arg Phe Arg Met Gly Glu Leu  
705 710 715 720

Cys Lys Val Ala Glu Asp Asp Phe Arg Leu Cys Leu Arg Ile Asn Glu  
725 730 735

Val Lys Trp Thr Glu Trp Lys Thr His Val Ser Phe Leu Asn Glu Asp  
740 745 750

Pro Gly Pro Val Arg Arg Thr Asp Phe Asn Lys Ile Gln Asp Ser Ser  
755 760 765

Arg Asn Asn Ser Lys Thr Thr Leu Asn Ala Phe Glu Glu Val Glu Glu  
770 775 780

Phe Pro Glu Thr Ser Val  
785 790

<210> 9  
<211> 871  
5 <212> PRT  
<213> Homo sapiens

<220>  
10 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA  
<222> (1)..(871)  
<223> TrpV4

<400> 9  
Met Ala Asp Ser Ser Glu Gly Pro Arg Ala Gly Pro Gly Glu Val Ala  
1 5 10 15

Glu Leu Pro Gly Asp Glu Ser Gly Thr Pro Gly Gly Glu Ala Phe Pro  
20 25 30

Leu Ser Ser Leu Ala Asn Leu Phe Glu Gly Glu Asp Gly Ser Leu Ser  
35 40 45

Pro Ser Pro Ala Asp Ala Ser Arg Pro Ala Gly Pro Gly Asp Gly Arg  
50 55 60

Pro Asn Leu Arg Met Lys Phe Gln Gly Ala Phe Arg Lys Gly Val Pro  
65 70 75 80

Asn Pro Ile Asp Leu Leu Glu Ser Thr Leu Tyr Glu Ser Ser Val Val  
85 90 95

Pro Gly Pro Lys Lys Ala Pro Met Asp Ser Leu Phe Asp Tyr Gly Thr  
100 105 110

Tyr Arg His His Ser Ser Asp Asn Lys Arg Trp Arg Lys Lys Ile Ile  
115 120 125

ES 2 464 459 T3

Glu Lys Gln Pro Gln Ser Pro Lys Ala Pro Ala Pro Gln Pro Pro Pro  
 130 135 140  
 Ile Leu Lys Val Phe Asn Arg Pro Ile Leu Phe Asp Ile Val Ser Arg  
 145 150 155 160  
 Gly Ser Thr Ala Asp Leu Asp Gly Leu Leu Pro Phe Leu Leu Thr His  
 165 170 175  
 Lys Lys Arg Leu Thr Asp Glu Glu Phe Arg Glu Pro Ser Thr Gly Lys  
 180 185 190  
 Thr Cys Leu Pro Lys Ala Leu Leu Asn Leu Ser Asn Gly Arg Asn Asp  
 195 200 205  
 Thr Ile Pro Val Leu Leu Asp Ile Ala Glu Arg Thr Gly Asn Met Arg  
 210 215 220  
 Glu Phe Ile Asn Ser Pro Phe Arg Asp Ile Tyr Tyr Arg Gly Gln Thr  
 225 230 235 240  
 Ala Leu His Ile Ala Ile Glu Arg Arg Cys Lys His Tyr Val Glu Leu  
 245 250 255  
 Leu Val Ala Gln Gly Ala Asp Val His Ala Gln Ala Arg Gly Arg Phe  
 260 265 270  
 Phe Gln Pro Lys Asp Glu Gly Gly Tyr Phe Tyr Phe Gly Glu Leu Pro  
 275 280 285  
 Leu Ser Leu Ala Ala Cys Thr Asn Gln Pro His Ile Val Asn Tyr Leu  
 290 295 300  
 Thr Glu Asn Pro His Lys Lys Ala Asp Met Arg Arg Gln Asp Ser Arg  
 305 310 315 320  
 Gly Asn Thr Val Leu His Ala Leu Val Ala Ile Ala Asp Asn Thr Arg  
 325 330 335  
 Glu Asn Thr Lys Phe Val Thr Lys Met Tyr Asp Leu Leu Leu Leu Lys  
 340 345 350  
 Cys Ala Arg Leu Phe Pro Asp Ser Asn Leu Glu Ala Val Leu Asn Asn  
 355 360 365  
 Asp Gly Leu Ser Pro Leu Met Met Ala Ala Lys Thr Gly Lys Ile Gly  
 370 375 380  
 Ile Phe Gln His Ile Ile Arg Arg Glu Val Thr Asp Glu Asp Thr Arg  
 385 390 395 400

ES 2 464 459 T3

His Leu Ser Arg Lys Phe Lys Asp Trp Ala Tyr Gly Pro Val Tyr Ser  
 405 410 415  
 Ser Leu Tyr Asp Leu Ser Ser Leu Asp Thr Cys Gly Glu Glu Ala Ser  
 420 425 430  
 Val Leu Glu Ile Leu Val Tyr Asn Ser Lys Ile Glu Asn Arg His Glu  
 435 440 445  
 Met Leu Ala Val Glu Pro Ile Asn Glu Leu Leu Arg Asp Lys Trp Arg  
 450 455 460  
 Lys Phe Gly Ala Val Ser Phe Tyr Ile Asn Val Val Ser Tyr Leu Cys  
 465 470 475 480  
 Ala Met Val Ile Phe Thr Leu Thr Ala Tyr Tyr Gln Pro Leu Glu Gly  
 485 490 495  
 Thr Pro Pro Tyr Pro Tyr Arg Thr Thr Val Asp Tyr Leu Arg Leu Ala  
 500 505 510  
 Gly Glu Val Ile Thr Leu Phe Thr Gly Val Leu Phe Phe Phe Thr Asn  
 515 520 525  
 Ile Lys Asp Leu Phe Met Lys Lys Cys Pro Gly Val Asn Ser Leu Phe  
 530 535 540  
 Ile Asp Gly Ser Phe Gln Leu Leu Tyr Phe Ile Tyr Ser Val Leu Val  
 545 550 555 560  
 Ile Val Ser Ala Ala Leu Tyr Leu Ala Gly Ile Glu Ala Tyr Leu Ala  
 565 570 575  
 Val Met Val Phe Ala Leu Val Leu Gly Trp Met Asn Ala Leu Tyr Phe  
 580 585 590  
 Thr Arg Gly Leu Lys Leu Thr Gly Thr Tyr Ser Ile Met Ile Gln Lys  
 595 600 605  
 Ile Leu Phe Lys Asp Leu Phe Arg Phe Leu Leu Val Tyr Leu Leu Phe  
 610 615 620  
 Met Ile Gly Tyr Ala Ser Ala Leu Val Ser Leu Leu Asn Pro Cys Ala  
 625 630 635 640  
 Asn Met Lys Val Cys Asn Glu Asp Gln Thr Asn Cys Thr Val Pro Thr  
 645 650 655  
 Tyr Pro Ser Cys Arg Asp Ser Glu Thr Phe Ser Thr Phe Leu Leu Asp  
 660 665 670

ES 2 464 459 T3

Leu Phe Lys Leu Thr Ile Gly Met Gly Asp Leu Glu Met Leu Ser Ser  
675 680 685

Thr Lys Tyr Pro Val Val Phe Ile Ile Leu Leu Val Thr Tyr Ile Ile  
690 695 700

Leu Thr Phe Val Leu Leu Leu Asn Met Leu Ile Ala Leu Met Gly Glu  
705 710 715 720

Thr Val Gly Gln Val Ser Lys Glu Ser Lys His Ile Trp Lys Leu Gln  
725 730 735

Trp Ala Thr Thr Ile Leu Asp Ile Glu Arg Ser Phe Pro Val Phe Leu  
740 745 750

Arg Lys Ala Phe Arg Ser Gly Glu Met Val Thr Val Gly Lys Ser Ser  
755 760 765

Asp Gly Thr Pro Asp Arg Arg Trp Cys Phe Arg Val Asp Glu Val Asn  
770 775 780

Trp Ser His Trp Asn Gln Asn Leu Gly Ile Ile Asn Glu Asp Pro Gly  
785 790 795 800

Lys Asn Glu Thr Tyr Gln Tyr Tyr Gly Phe Ser His Thr Val Gly Arg  
805 810 815

Leu Arg Arg Asp Arg Trp Ser Ser Val Val Pro Arg Val Val Glu Leu  
820 825 830

Asn Lys Asn Ser Asn Pro Asp Glu Val Val Val Pro Leu Asp Ser Met  
835 840 845

Gly Asn Pro Arg Cys Asp Gly His Gln Gln Gly Tyr Pro Arg Lys Trp  
850 855 860

Arg Thr Asp Asp Ala Pro Leu  
865 870

5 <210> 10  
<211> 796  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

10 <220>  
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA  
<222> (1)...(796)  
<223> TrkA

15 <400> 10  
Met Leu Arg Gly Gly Arg Arg Gly Gln Leu Gly Trp His Ser Trp Ala  
1 5 10 15

ES 2 464 459 T3

Ala Gly Pro Gly Ser Leu Leu Ala Trp Leu Ile Leu Ala Ser Ala Gly  
 20 25 30

Ala Ala Pro Cys Pro Asp Ala Cys Cys Pro His Gly Ser Ser Gly Leu  
 35 40 45

Arg Cys Thr Arg Asp Gly Ala Leu Asp Ser Leu His His Leu Pro Gly  
 50 55 60

Ala Glu Asn Leu Thr Glu Leu Tyr Ile Glu Asn Gln Gln His Leu Gln  
 65 70 75 80

His Leu Glu Leu Arg Asp Leu Arg Gly Leu Gly Glu Leu Arg Asn Leu  
 85 90 95

Thr Ile Val Lys Ser Gly Leu Arg Phe Val Ala Pro Asp Ala Phe His  
 100 105 110

Phe Thr Pro Arg Leu Ser Arg Leu Asn Leu Ser Phe Asn Ala Leu Glu  
 115 120 125

Ser Leu Ser Trp Lys Thr Val Gln Gly Leu Ser Leu Gln Glu Leu Val  
 130 135 140

Leu Ser Gly Asn Pro Leu His Cys Ser Cys Ala Leu Arg Trp Leu Gln  
 145 150 155 160

Arg Trp Glu Glu Glu Gly Leu Gly Gly Val Pro Glu Gln Lys Leu Gln  
 165 170 175

Cys His Gly Gln Gly Pro Leu Ala His Met Pro Asn Ala Ser Cys Gly  
 180 185 190

Val Pro Thr Leu Lys Val Gln Val Pro Asn Ala Ser Val Asp Val Gly  
 195 200 205

Asp Asp Val Leu Leu Arg Cys Gln Val Glu Gly Arg Gly Leu Glu Gln  
 210 215 220

Ala Gly Trp Ile Leu Thr Glu Leu Glu Gln Ser Ala Thr Val Met Lys  
 225 230 235 240

Ser Gly Gly Leu Pro Ser Leu Gly Leu Thr Leu Ala Asn Val Thr Ser  
 245 250 255

Asp Leu Asn Arg Lys Asn Val Thr Cys Trp Ala Glu Asn Asp Val Gly  
 260 265 270

Arg Ala Glu Val Ser Val Gln Val Asn Val Ser Phe Pro Ala Ser Val  
 275 280 285

Gln Leu His Thr Ala Val Glu Met His His Trp Cys Ile Pro Phe Ser



ES 2 464 459 T3

Gly Val Cys Thr Glu Gly Arg Pro Leu Leu Met Val Phe Glu Tyr Met  
580 585 590

Arg His Gly Asp Leu Asn Arg Phe Leu Arg Ser His Gly Pro Asp Ala  
595 600 605

Lys Leu Leu Ala Gly Gly Glu Asp Val Ala Pro Gly Pro Leu Gly Leu  
610 615 620

Gly Gln Leu Leu Ala Val Ala Ser Gln Val Ala Ala Gly Met Val Tyr  
625 630 635 640

Leu Ala Gly Leu His Phe Val His Arg Asp Leu Ala Thr Arg Asn Cys  
645 650 655

Leu Val Gly Gln Gly Leu Val Val Lys Ile Gly Asp Phe Gly Met Ser  
660 665 670

Arg Asp Ile Tyr Ser Thr Asp Tyr Tyr Arg Val Gly Gly Arg Thr Met  
675 680 685

Leu Pro Ile Arg Trp Met Pro Pro Glu Ser Ile Leu Tyr Arg Lys Phe  
690 695 700

Thr Thr Glu Ser Asp Val Trp Ser Phe Gly Val Val Leu Trp Glu Ile  
705 710 715 720

Phe Thr Tyr Gly Lys Gln Pro Trp Tyr Gln Leu Ser Asn Thr Glu Ala  
725 730 735

Ile Asp Cys Ile Thr Gln Gly Arg Glu Leu Glu Arg Pro Arg Ala Cys  
740 745 750

Pro Pro Glu Val Tyr Ala Ile Met Arg Gly Cys Trp Gln Arg Glu Pro  
755 760 765

Gln Gln Arg His Ser Ile Lys Asp Val His Ala Arg Leu Gln Ala Leu  
770 775 780

Ala Gln Ala Pro Pro Val Tyr Leu Asp Val Leu Gly  
785 790 795

**REIVINDICACIONES**

1. Un procedimiento in vitro para detectar un agente que es capaz de inhibir la formación de un:
  - a. complejo binario del receptor de dominio Vps10p : receptor Trpv, y/o
  - b. complejo ternario del receptor de dominio Vps10p : TrkA : receptor Trpv, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:
    - i. proporcionar un receptor de dominio Vps10p y un receptor Trpv, o
    - ii. proporcionar un receptor de dominio Vps10p y un receptor Trpv y un receptor TrkA, y
    - iii. proporcionar una biblioteca de agentes potenciales, y
    - iv. proporcionar un ensayo para medir la unión de una primera entidad receptor de dominio Vps10p a una segunda entidad receptor Trpv, o
    - v. proporcionar un ensayo para medir la unión de una primera entidad receptor Trpv a una segunda entidad receptor de dominio Vps10p, o
    - vi. proporcionar un ensayo para medir la unión de una primera entidad receptor Trpv a una segunda entidad complejo binario (receptor de dominio Vps10p : receptor TrkA), o
    - vii. proporcionar un ensayo para medir la unión de una primera entidad complejo binario (receptor de dominio Vps10p : receptor TrkA) a una segunda entidad receptor Trpv, o
    - viii. proporcionar un ensayo para medir la unión de una primera entidad receptor de dominio Vps10p a una segunda entidad complejo binario (TrpV : receptor TrkA), o
    - ix. proporcionar un ensayo para medir la unión de una primera entidad complejo binario (TrpV : receptor TrkA) a una segunda entidad receptor de dominio Vps10p, o
    - x. proporcionar un ensayo para medir la unión de una primera entidad receptor TrkA a una segunda entidad complejo binario (TrpV : Receptor del dominio Vps10p), o
    - xi. proporcionar un ensayo para medir la unión de una primera entidad complejo binario (TrpV : receptor de dominio Vps10p) a una segunda entidad receptor TrkA, y
    - xii. añadir la biblioteca de agentes potenciales que deben ser ensayados al ensayo seleccionado de iv a xi, y
    - xiii. determinar la cantidad de dicha primera entidad respecto de dicho segunda entidad, y
    - xiv. comparar la cantidad determinada en la etapa xiv) con una cantidad medida en ausencia del agente que debe ser ensayado, en el que la diferencia en las dos cantidades identifica un agente que altera la unión de la primera entidad respecto de la segunda entidad.
2. El procedimiento de de acuerdo a la reivindicación 1, en el que dicho receptor de dominio Vps10p se selecciona del grupo que consiste en SEC ID NO. 1, SEC ID NO. 2, SEC ID NO. 3, SEC ID NO. 4 y SEC ID NO. 5.
3. El procedimiento de de acuerdo a la reivindicación 1, en el que dicho receptor Trpv es al menos 60% idéntico, tal como 65% idéntico, tal como 70% idéntico, tal como 75% idéntico, tal como 80% idéntico, tal como 85% idéntico, tal como 90% idéntico, tal como 95% idéntico, tal como 96% idéntico, tal como 97% idéntico, tal como 98% idéntico, tal como 99% idéntico, tal como 100% idéntico a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEC ID NO. 6, SEC ID NO. 7, SEC ID NO. 8 y SEC ID NO. 9.
4. El procedimiento de de acuerdo a la reivindicación 1, en el que el receptor TrkA es al menos 60% idéntico, tal como 65% idéntico, tal como 70% idéntico, tal como 75% idéntico, tal como 80% idéntico, tal como 85% idéntico, tal como 90% idéntico, tal como 95% idéntico, tal como 96% idéntico, tal como 97% idéntico, tal como 98% idéntico, tal como 99% idéntico, tal como 100% idéntico a SEC ID NO. 10.
5. El procedimiento de de acuerdo a la reivindicación 1, en el que el agente es un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en: anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, anticuerpos humanizados, anticuerpos de cadena simple, anticuerpos recombinantes, fragmentos de anticuerpos incluyendo fragmentos Fab.
6. El procedimiento de de acuerdo a la reivindicación 5, en el que el anticuerpo está dirigido contra una parte extracelular o una parte intracelular del receptor de dominio Vps10p o el dominio intracelular del receptor de dominio Vps10p.
7. El procedimiento de de acuerdo a la reivindicación 6, en el que el receptor de dominio Vps10p es Sortilina

(SEC ID NO.: 1).

- 5 8. El procedimiento de acuerdo a la reivindicación 7, en el que el anticuerpo se une a un epítipo que comprende al menos un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en R325, S316, Y351, I353, K260, I327, F314, F350 a M363, S305, F306, T398 a G400, I303-G309, Q349-A356, Y395 y T402 de SEC ID NO. 1 o un fragmento biológicamente activo o variante del mismo.
9. El procedimiento de acuerdo a la reivindicación 7, en el que el anticuerpo se une a un epítipo que comprende al menos un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en L572, L114, V112, R109 a S111, S115 a G118, T570, G571, W586, W597, T168-I174, L572, A573 y S584 a F588 de SEC ID NO. 1 o un fragmento biológicamente activo o variante del mismo.
- 10 10. El procedimiento de acuerdo a la reivindicación 7 en el que el anticuerpo se une a un epítipo que comprende al menos un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en D403, S420, D422, N423, S424, I425, E426, T451, Y466, E470, I498, S499 y V500 de SEC ID NO. 1 o un fragmento biológicamente activo o variante del mismo.
- 15 11. El procedimiento de acuerdo a la reivindicación 7 en el que el anticuerpo se une a un epítipo que comprende al menos un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en T451, Y466, I498 y V500 de SEC ID NO. 1 o un fragmento biológicamente activo o variante del mismo.
12. El procedimiento de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 5-11, en el que el anticuerpo es seleccionado de los anticuerpos que se describen en la tabla 1.
- 20 13. El procedimiento de acuerdo a la reivindicación 5-12, en el que el anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en anti-dominio antiextracelular de cabra de un anticuerpo de SorLA humana, dominio anti-citoplásmico de conejo de anticuerpo SorLA humana, repetición anti-complementaria de conejo de anticuerpo de SorLA humana, dominio antiextracelular de conejo de anticuerpo de SorLA humana, dominio anticitoplasmático de conejo de anticuerpo de SorLA humana, dominio anti-Vps10p de conejo de anticuerpo de SorLA humana, secuencia antipeptídica de conejo en el dominio Vps10p de anticuerpo de SorLA humana, anti-C-terminal de conejo de anticuerpo de SorLA humana, cola anticitoplasmática de conejo de anticuerpo de SorLA humana, dominio antiextracelular de ratón de anticuerpo de SorLA humana, dominio antiextracelular de conejo de anticuerpo de Sortilina humana, dominio anticitoplasmático de conejo de anticuerpo de Sortilina humana, anti-propéptido de conejo de anticuerpo de Sortilina humana, dominio anti-Vps10p de conejo de anticuerpo de Sortilina humana, dominio antiextracelular de cabra de Sortilina humana, dominio antiextracelular de ratón de anticuerpo de Sortilina humana, dominio antiextracelular de cabra de anticuerpo de SorCS1 humana, dominio antiextracelular de conejo de anticuerpo de SorCS1 humana, dominio antiextracelular de ratón de anticuerpo de SorCS1 humana, dominio antiextracelular de oveja de anticuerpo de SorCS2 humana, dominio antiextracelular de cabra de anticuerpo de SorCS2 humana, dominio antiextracelular de conejo de anticuerpo de SorCS2 humana, aminoácidos del extremo terminal C anti-28 de conejo de SorCS2 humana, anti-propéptido de conejo de anticuerpo de SorCS2 humana, dominio antiextracelular de ratón de SorCS2 humana, aminoácidos del extremo terminal C anti-15 de conejo de anticuerpo de SorCS3 humana, dominio anti-N-terminal de conejo de anticuerpo de SorCS3 humana, dominio antiextracelular de conejo de SorCS3 humana, dominio antiextracelular de ratón de SorCS3 humana y dominio antiextracelular de cabra de anticuerpo de SorCS3 humana.
- 35 14. El procedimiento de acuerdo a la reivindicación 5, en el que el anticuerpo está dirigido contra el receptor Trpv.
- 40 15. El procedimiento de acuerdo a la reivindicación 5, en el que el anticuerpo está dirigido contra el receptor TrkA.

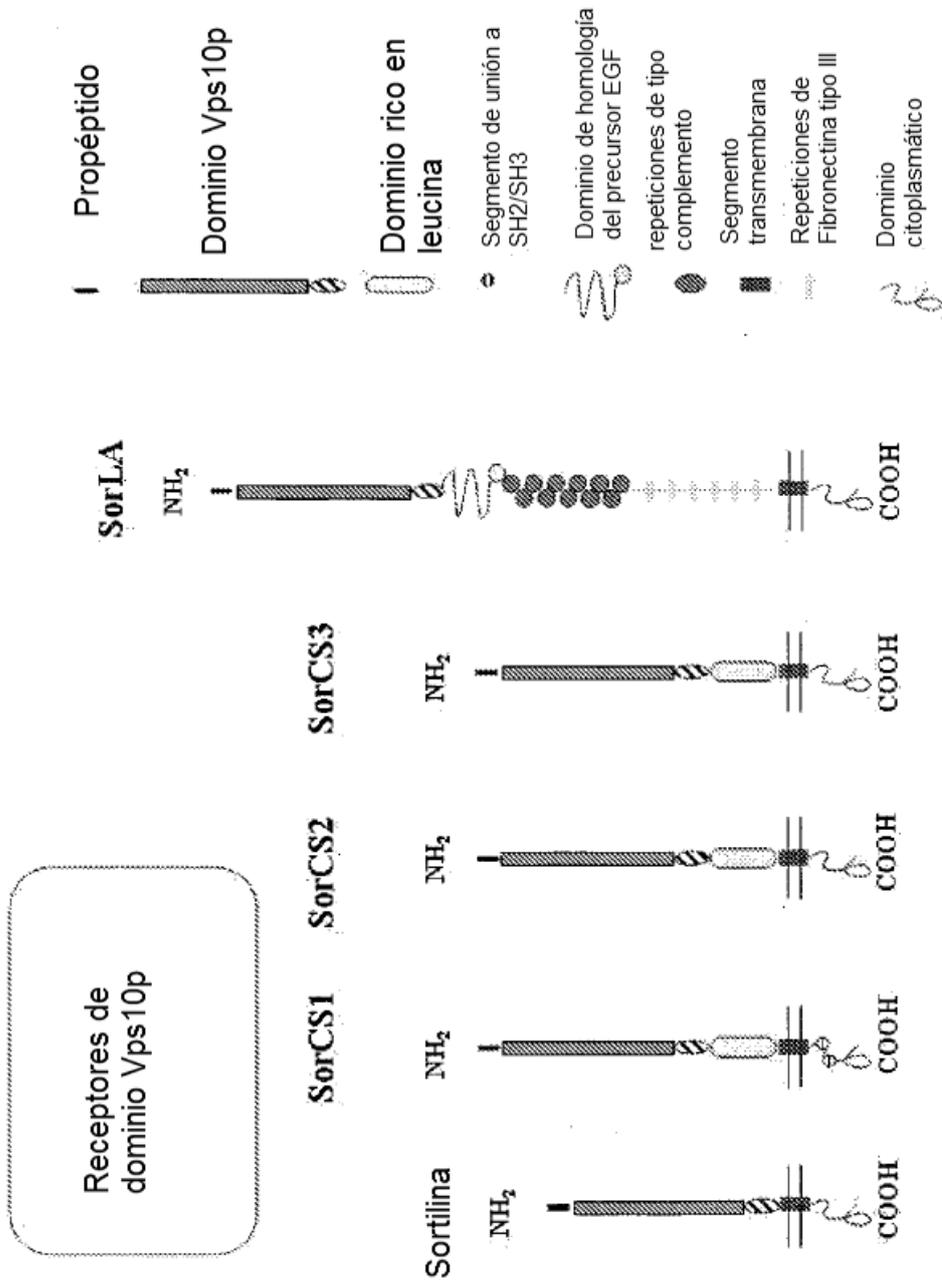


Fig. 1

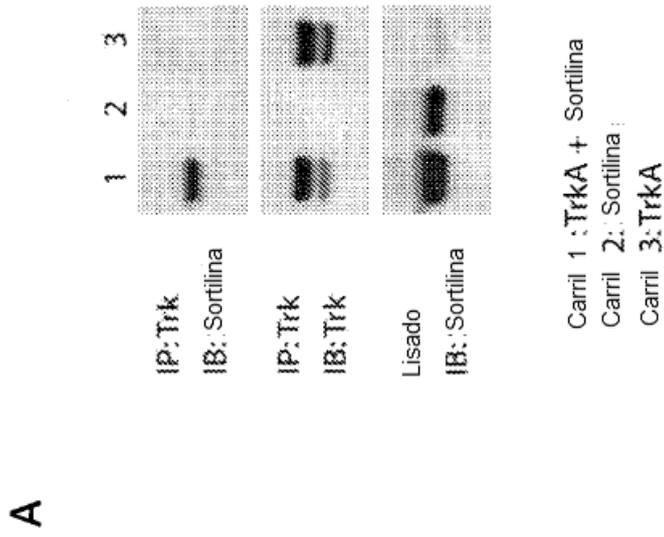
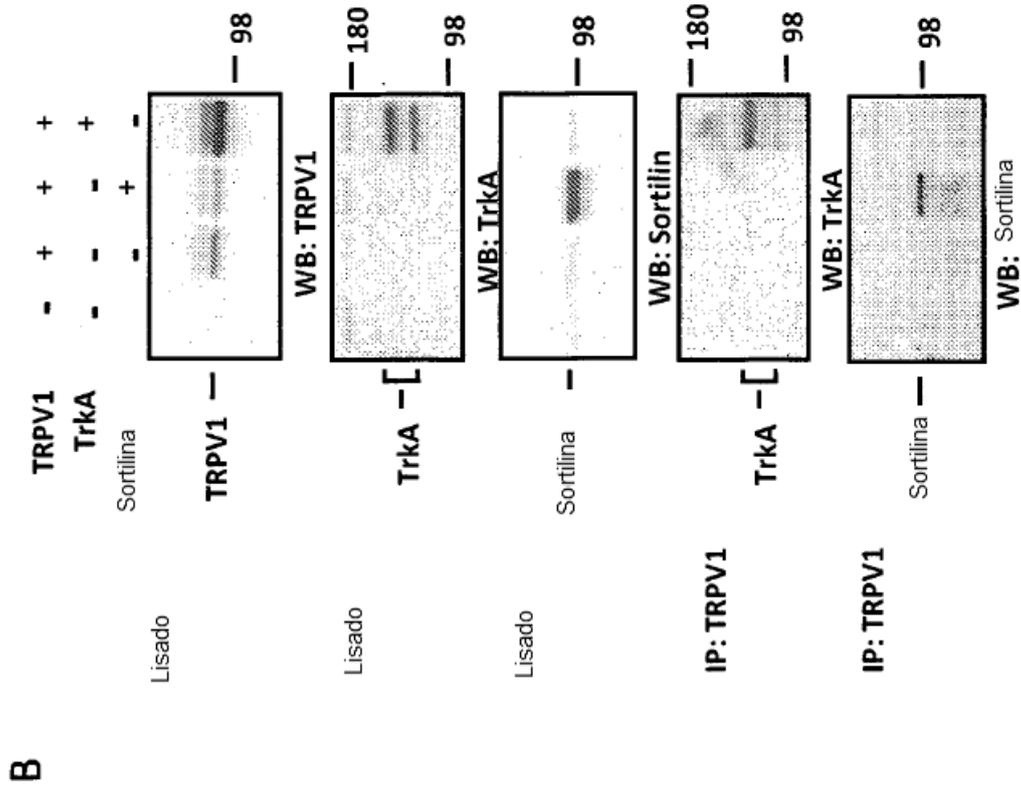


Fig. 2

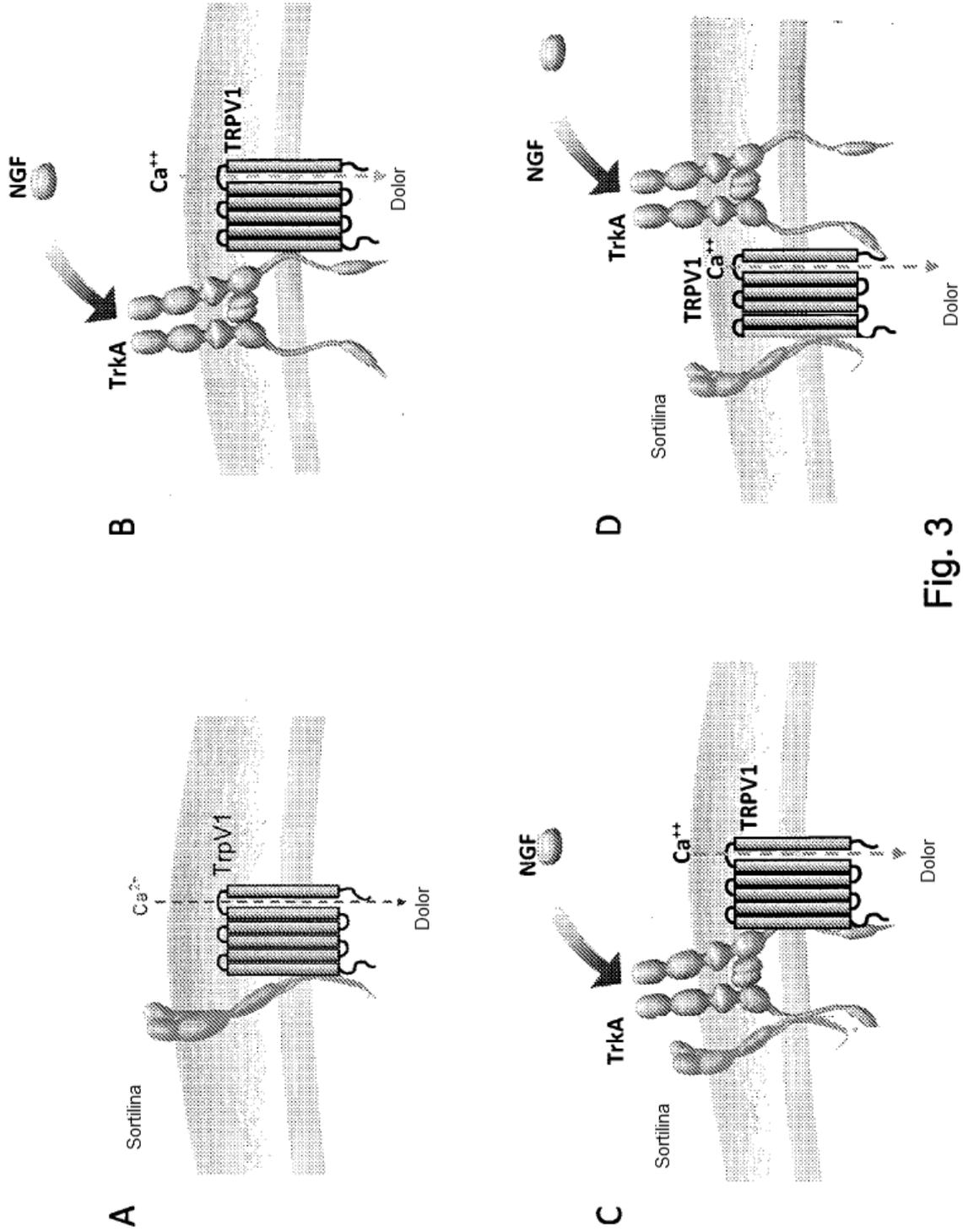
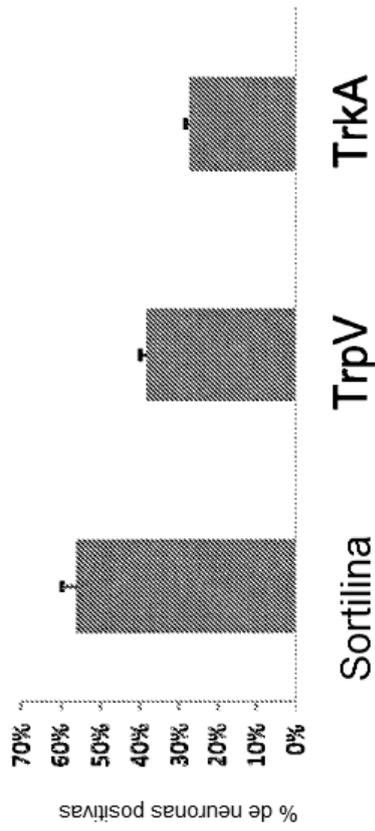
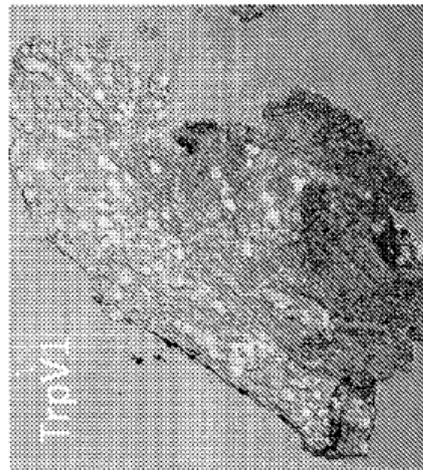
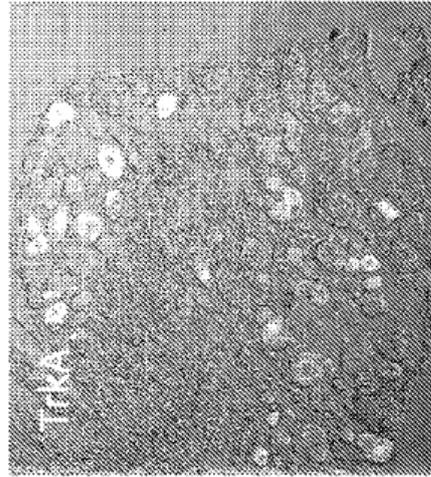
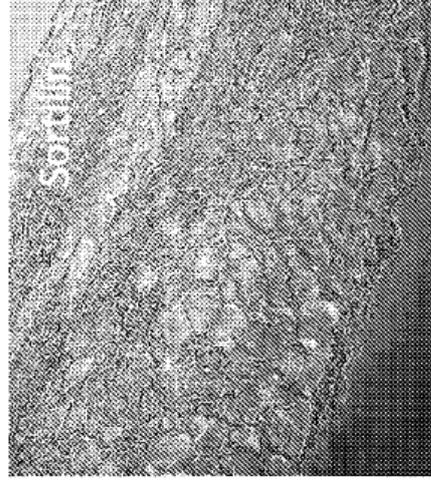


Fig. 3

Perfil de ganglios radiculares posteriores



A



B

Fig. 4

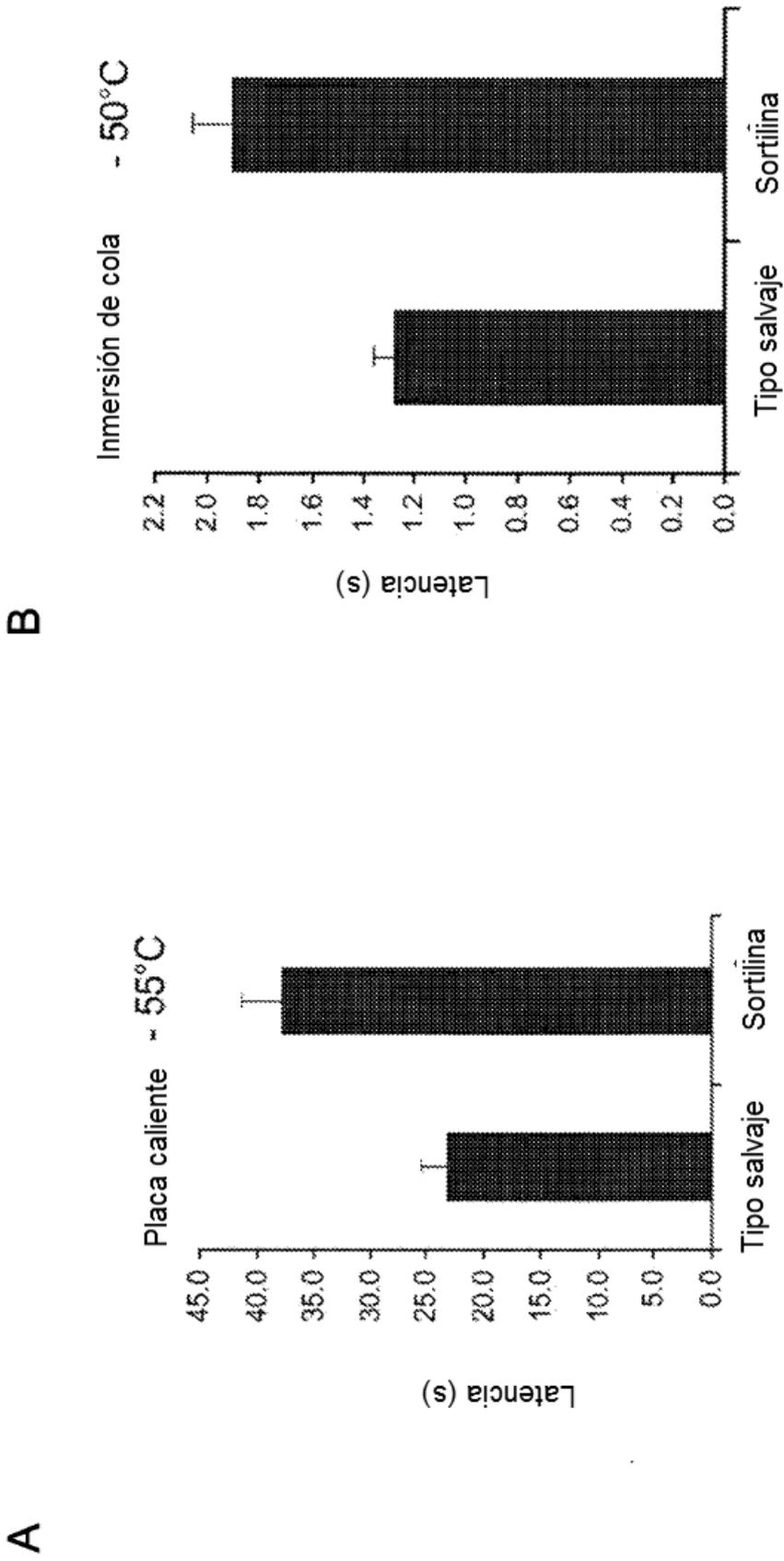
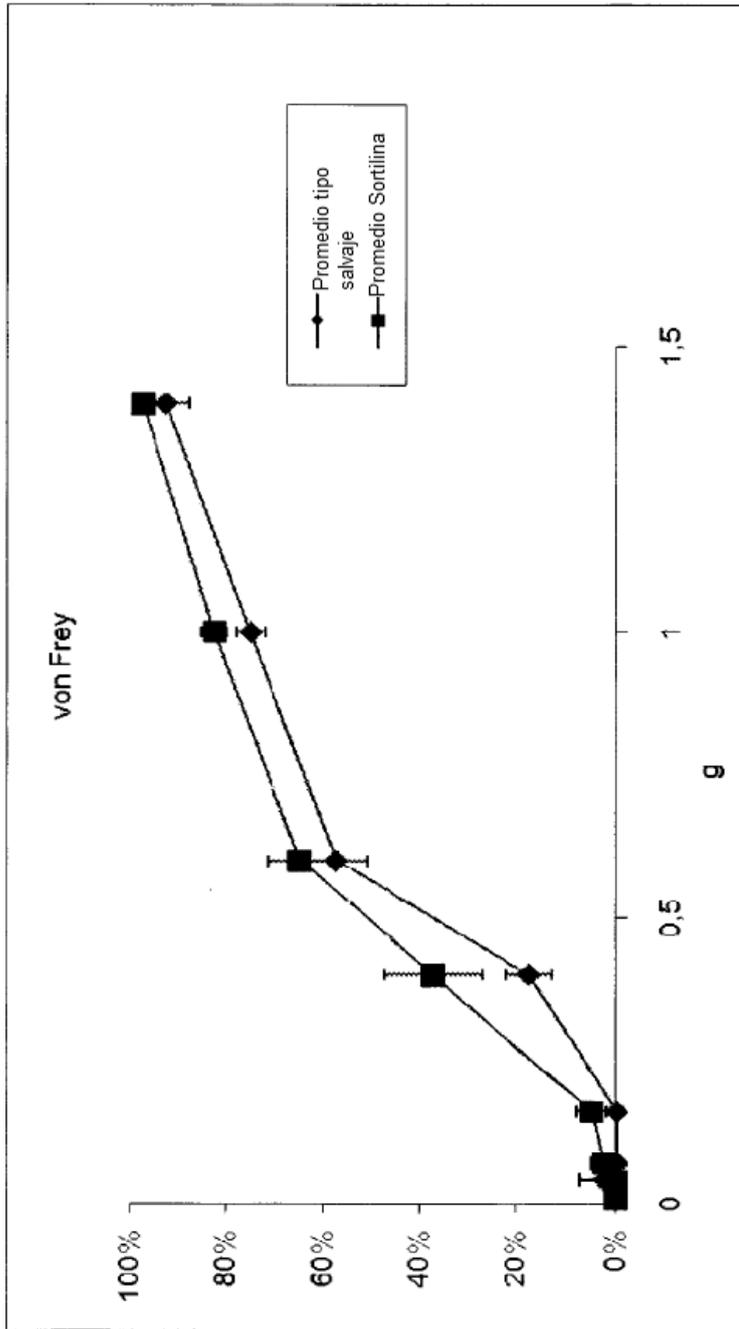


Fig. 5



C



| Ensayo t                   | 0.16   | 0.4    | 0.6    | 1      | 1.4    |
|----------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Tipo salvaje vs. Sortilina | 0.1817 | 0.1492 | 0.4373 | 0.0981 | 0.4012 |

Fig. 5 (Continuación)

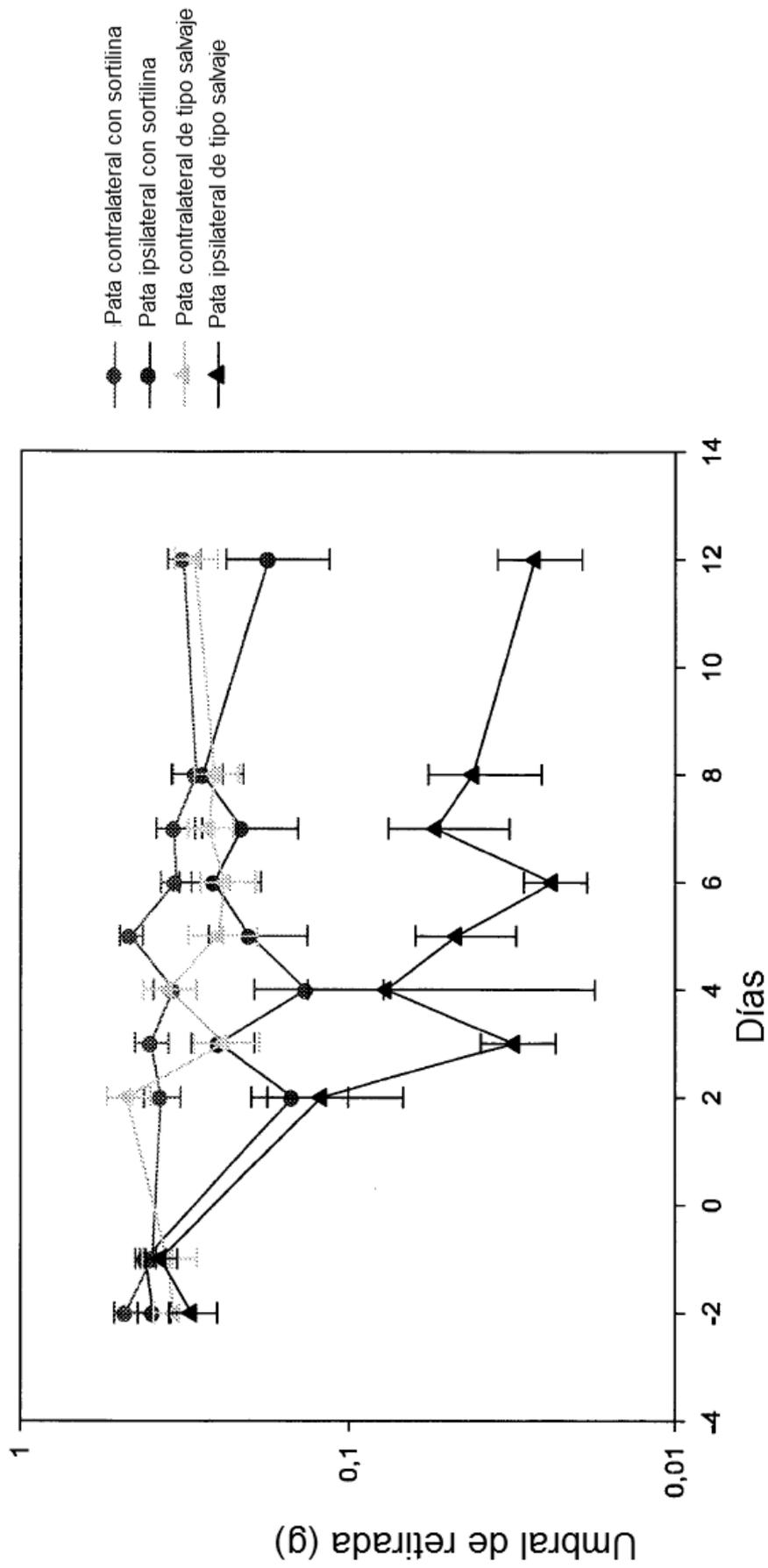


Fig. 6

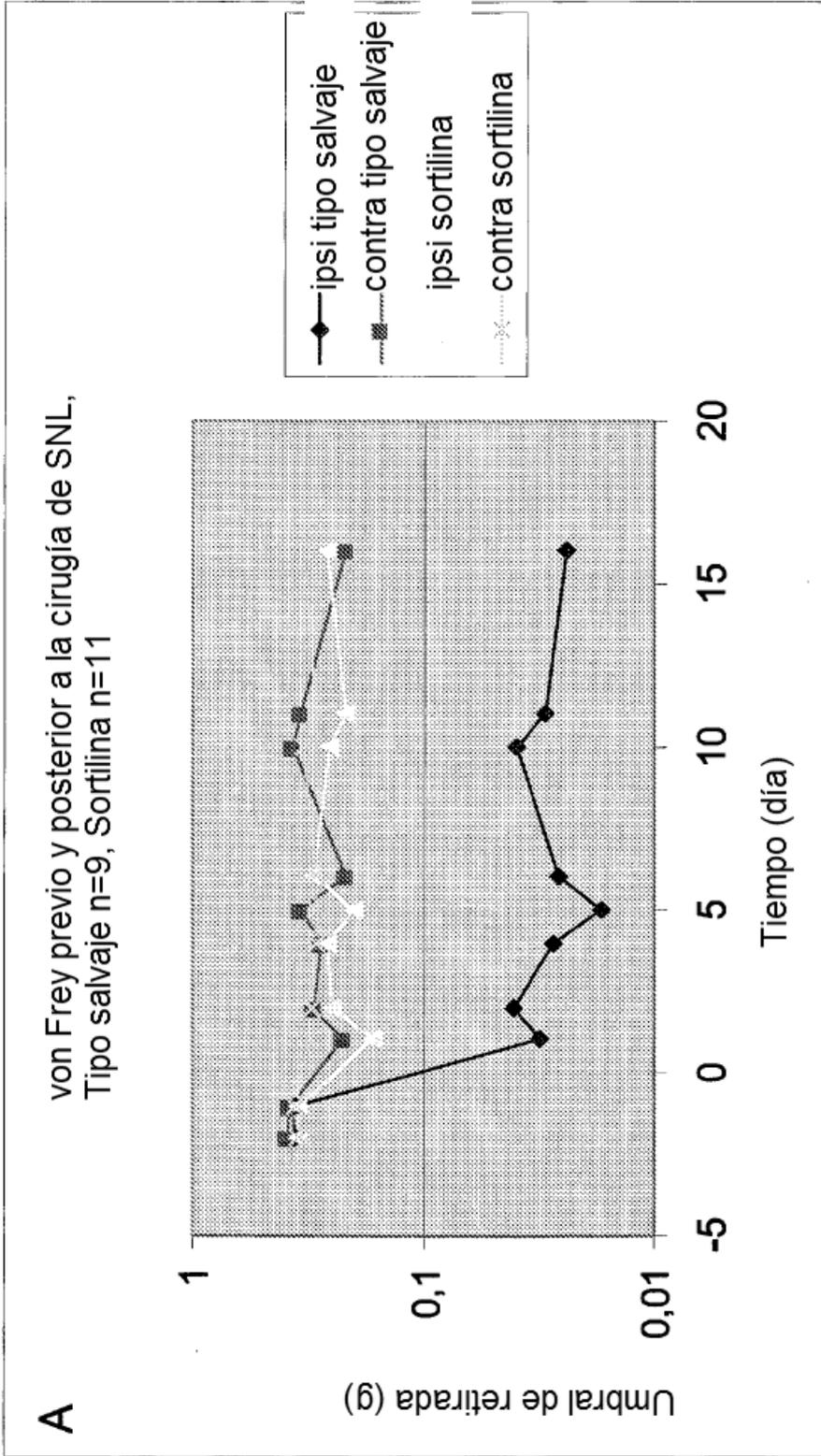


Fig. 7

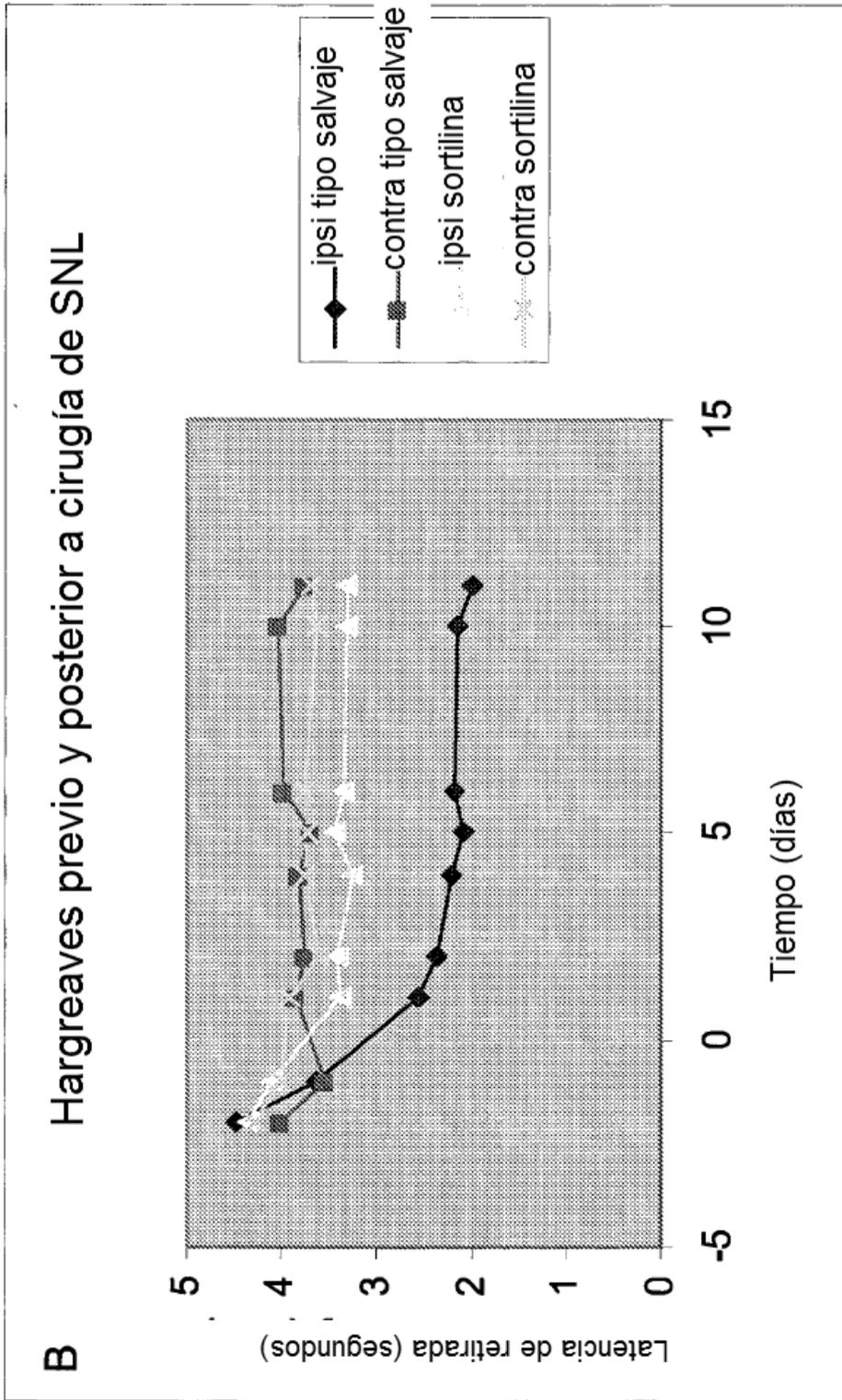
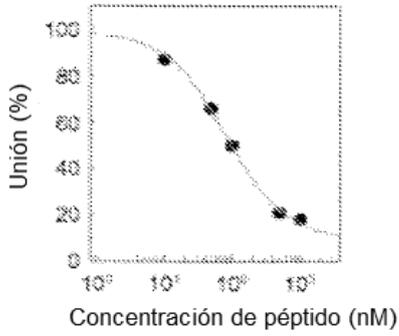
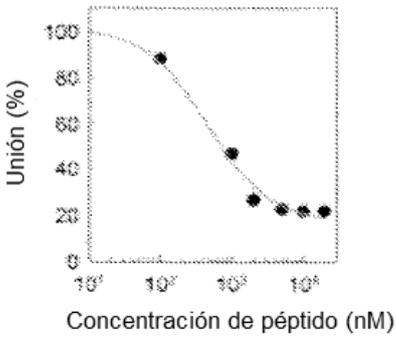
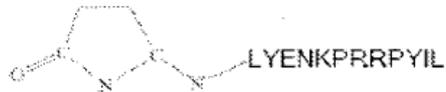


Fig. 7, (continuación)

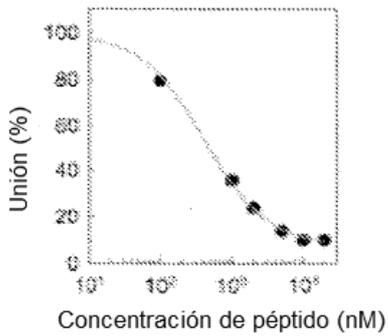
Competencia por la unión a sSortilina inmovilizadas entre 100 nM GST etiquetado con YIL (GST-YIL) y los péptidos especificados



Péptido : NT  
 EC50: 81nM  
 Secuencia : pELYENKPRRPYIL  
 Estructura:



Péptido : NT8-13  
 EC50: 460nM  
 Secuencia : RRPYIL



Péptido : RRPYI(chg)  
 EC50: 420nM  
 Secuencia : RRPYI-ciclo-hexil-glicina  
 Estructura:

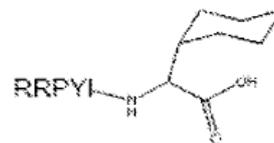


Fig. 8

Competencia por la unión a sSortilina inmovilizadas entre 100 nM GST etiquetado con YIL (GST-YIL) y los péptidos especificados

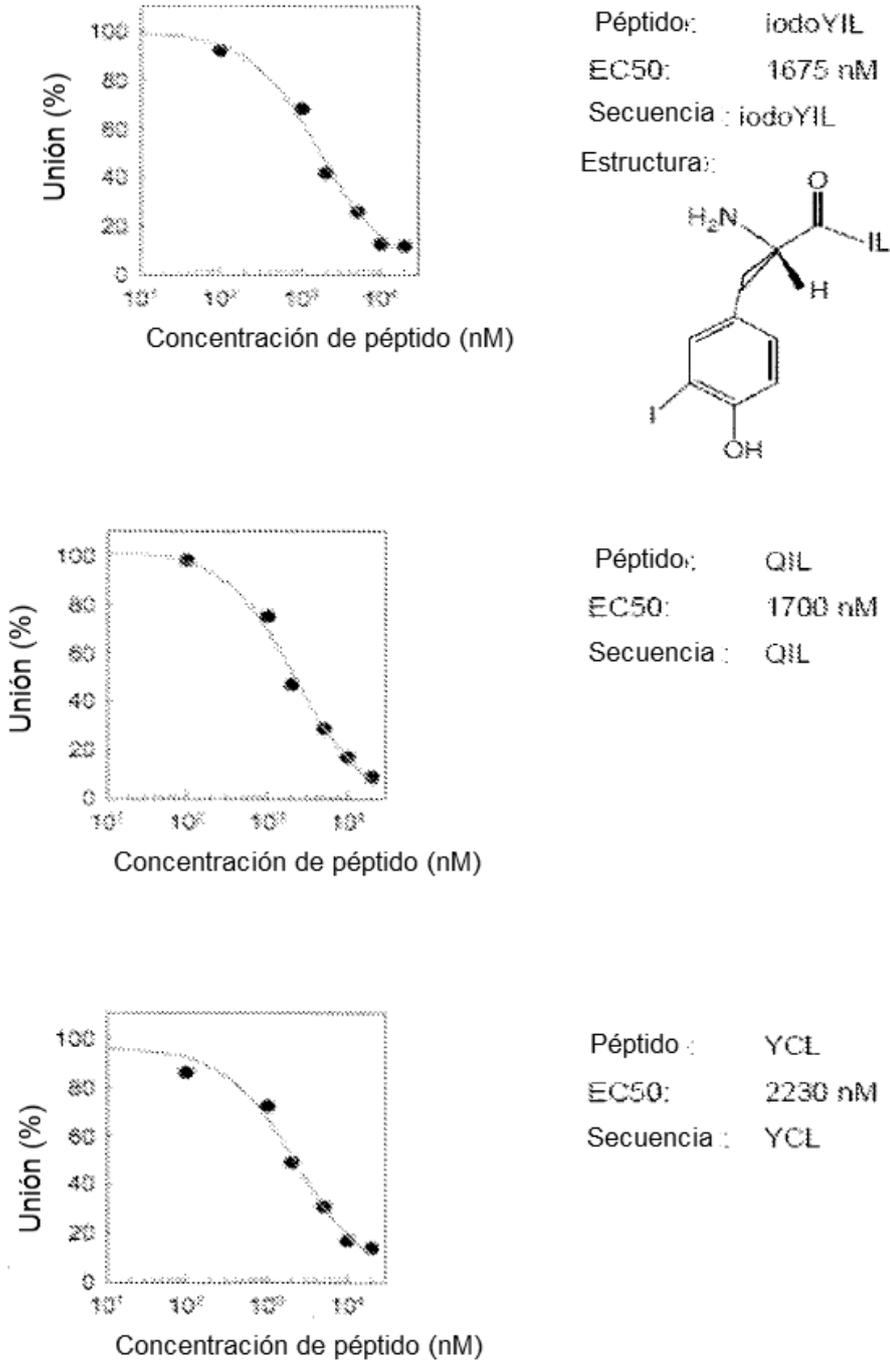


Fig. 8, (continuación)

Competencia por la unión a sSortilina inmovilizadas entre 100 nM GST etiquetado con YIL (GST-YIL) y los péptidos especificados

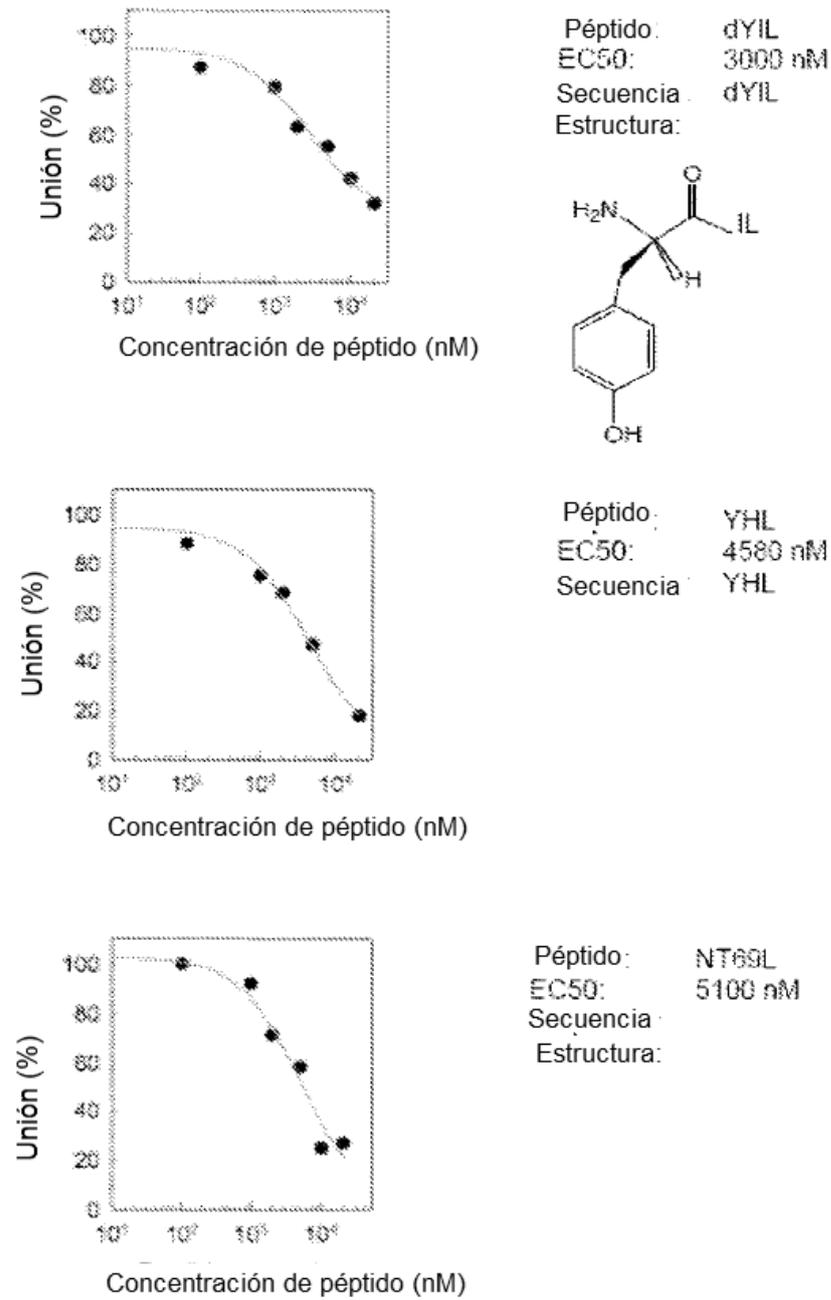
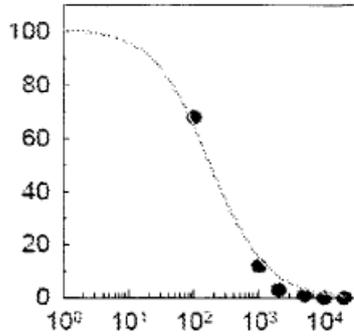
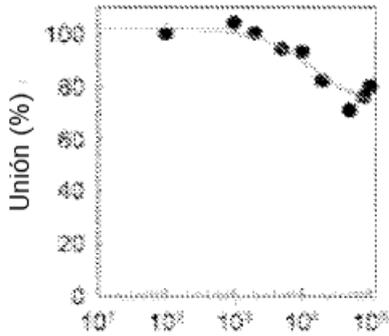


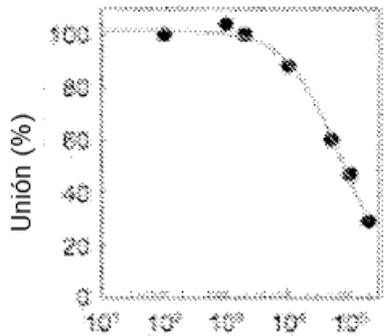
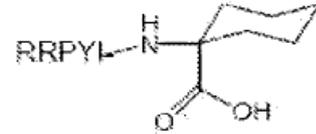
Fig. 8,(continuación)



Péptido: GST-YIL (100nM)  
 EC50: 200nM  
 Secuencia: YIL  
 Estructura:



Péptido: RRPYI(acc)  
 EC50: 14000 nM  
 Secuencia: RRPYI-1-amino-carboxi-ciclohexil  
 Estructura:



Péptido: RRPYI(nMe)L  
 EC50: 68000 nM  
 Secuencia: RRPYI-N-metil-Leucina  
 Estructura:

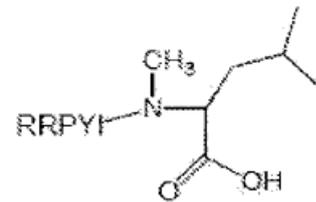


Fig. 8, (continuación)