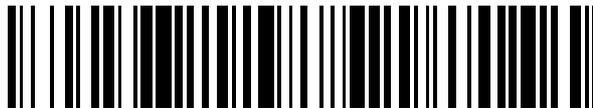


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 486 116**

21 Número de solicitud: 201330192

51 Int. Cl.:

C07K 14/705 (2006.01)

C12N 15/12 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

14.02.2013

43 Fecha de publicación de la solicitud:

14.08.2014

71 Solicitantes:

**UNIVERSIDAD DE SALAMANCA (100.0%)
Patio de Escuelas, 1
37008 Salamanca ES**

72 Inventor/es:

**ARÉVALO MARTÍN, Juan Carlos y
RODRÍGUEZ RODRÍGUEZ, Raquel E.**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

54 Título: **ANTICUERPO FRENTE AL RECEPTOR OPIOIDE TIPO DELTA1b DE DANIO RERIO**

57 Resumen:

Anticuerpo frente al receptor opioide tipo Delta1b de danio rerio.

La presente invención proporciona anticuerpos, preferiblemente policlonales, específicos frente al receptor opioide tipo Delta1b de pez cebra, los cuales son capaces de reconocer dicho receptor específicamente sin presentar reactividad cruzada con otros tipos receptores opioides. Además, la invención proporciona un antígeno del receptor opioide tipo Delta1b de pez cebra empleado para la generación de dichos anticuerpos, así como un método de obtención de dichos anticuerpos y un kit que comprende dichos anticuerpos para la detección del receptor opioide tipo Delta1b de pez cebra.

ES 2 486 116 A1

ANTICUERPO FRENTE AL RECEPTOR OPIOIDE TIPO DELTA1b DE *DANIO RERIO*

DESCRIPCIÓN

5 La presente invención se encuadra en el campo de la inmunología, específicamente dentro de los anticuerpos específicos frente a los receptores opioides de tipo Delta1b (D1b) de pez cebra (*Danio rerio*) y de sus métodos de obtención.

ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

10

Los receptores opioides pertenecen a la superfamilia de los receptores acoplados a proteínas G (GPCRs), cuya importancia estriba en que intervienen en el mecanismo de acción de muchas hormonas y neurotransmisores conocidos. Los receptores opioides están constituidos por un dominio N-terminal extracelular, 7 dominios transmembrana conectados por 3 lazos intracelulares y 3 lazos extracelulares y una cola C-terminal intracelular. Según su estructura tridimensional, es conocido que los dominios transmembrana de los receptores opioides forman hélices muy unidas, orientadas en contra de las agujas del reloj. Junto a los lazos extracelulares, esta estructura da lugar a una interfase dinámica a la cual se unen los ligandos opioides.

20

Los receptores opioides comparten una homología en su secuencia aminoacídica de aproximadamente un 60%. Existen desde el punto de vista farmacológico tres receptores opioides: mu, delta y kappa. Los receptores μ (MOR) presentan una alta afinidad por el agonista peptídico DAMGO, por la morfina y sus derivados, como la morfina-6- β -glucurónido, y por los antagonistas CTOP y naloxonacina, así como por las endorfinas, consideradas sus agonistas endógenos. Por su parte, los receptores opioides δ (DOR) tienen una alta afinidad por los agonistas DPDPE, DSLET, deltorfina II y por el antagonista naltrindol, compuestos que se unen con menor afinidad a los receptores κ y μ . Además, de acuerdo con estudios farmacológicos y de comportamiento, se ha propuesto la existencia de subtipos del receptor δ (Sofuoglu *et al.*, 1991, *Pharmacol Exp Ther.*, 257(2):676-680): el receptor δ 1, que es activado selectivamente por DPDPE y bloqueado por el antagonista BNTX; y el receptor δ 2 que es activado selectivamente por la deltorfina II y bloqueado por el antagonista NTB. Además, ambos subtipos son activados por los péptidos endógenos encefalinas y por la β -endorfina y bloqueados con alta afinidad por el antagonista naltrindol.

35

Se ha descrito que los receptores kappa, con muy poca afinidad por la morfina, están

relacionados con el sistema inmune. También se conoce un receptor tipo opioide (ORL), que no presenta actividad analgésica.

- Las sustancias opioides son conocidas fundamentalmente por su actividad analgésica, así como por su capacidad de inducir tolerancia, dependencia y en algunas ocasiones, adicción, tras un consumo prolongado. Sin embargo, la existencia de varios subtipos farmacológicos de cada receptor opioide, y la ausencia de caracterización genética que pudiera determinar si cada subtipo farmacológico procedía de un gen diferente, obligaron a la comunidad científica a abrir nuevas puertas en la investigación sobre la actividad del sistema opioide.
- Una vez clonados los tres genes que codifican para los tres receptores opioides clásicos, mu, delta y kappa, se comenzó a elucidar la actividad farmacológica y funcional de cada uno de estos receptores, y además de su capacidad analgésica, su posible implicación en distintos procesos que forman parte del desarrollo embrionario, como la proliferación celular, la neurogénesis, la diferenciación neuronal o la protección neuronal frente a diversos daños producidos por ausencia de oxígeno o por la presencia de alguna sustancia tóxica. En concreto, los receptores opioides mu y kappa potencian la neurogénesis, el receptor opioide kappa incrementa la tasa de proliferación celular cuando es activado por la morfina y el receptor opioide delta interviene tanto en neurogénesis como en protección neuronal.
- Trabajos previos han demostrado la estrecha relación que existe entre la caracterización molecular y farmacológica de los receptores opioides descritos hasta el momento (MOR, DOR, KOR y ORL) de pez cebra y de mamíferos avalando así la idoneidad del pez cebra como modelo experimental para el estudio de los mecanismos que describen el dolor y la drogodependencia. La evolución de los receptores opioides en las especies analizadas, incluida el pez cebra, ocurre de manera paralela, y así, el receptor mu de pez cebra es homólogo al receptor mu de humano, rata y ratón, y los receptores tipo delta de pez cebra son homólogos al receptor delta de mamífero.

- En concreto, en los últimos años se han clonado cinco receptores de pez cebra semejantes a los receptores opioides de mamíferos, a los que se ha denominado: ZFOR1 (del inglés, “Zebrafish Opioid Receptor 1”), actualmente llamado ZfDOR1, que presenta homología con el receptor opioide delta de mamíferos (Rodríguez *et al.*, 2000, *Neurosci Lett.*, 288(3):207-210); ZFOR2 (actualmente ZfMOR), que presenta homología con el receptor opioide mu (Barrallo *et al.*, 2000, *Brain Res Mol Brain Res.*, 84(1-2):1-6); ZFOR3 (actualmente ZfKOR), que presenta homología con el receptor opioide kappa (Alvarez *et al.*, 2006, *Neurosci Lett.*,

405(1-2):94-99); ZFOR4 (actualmente ZfDOR2), que es un duplicado de ZfDOR1 y, por ello, presenta mayor homología con el receptor opioide delta (Pinal- Seoane *et al.*, 2006, *J Mol Endocrinol.*, 37(3):391-403) y ZfORL, que presenta homología con el receptor ORL (Rivas-Boyero *et al.*, 2011, *J Mol Endocrinol.*).

5

El pez cebra (*Danio rerio*), un teleósteo originario del río Ganghes, se utiliza como modelo experimental para estudiar el desarrollo embrionario de los vertebrados ya que presenta una serie de ventajas sobre otros organismos que son utilizados como modelos experimentales, siendo relativamente fácil el manejo de sus embriones y la realización de sondeos genéticos que revelan las etapas y mecanismos de la embriogénesis.

10

Se ha señalado que el pez cebra es un sistema adecuado para determinar la funcionalidad de proteínas codificadas por el genoma humano, así como para estudiar el desarrollo del sistema nervioso e identificar anomalías metabólicas. En los últimos años el pez cebra está siendo utilizado como organismo modelo para el descubrimiento y validación de nuevas dianas farmacológicas, así como en estudios toxicológicos y en la búsqueda de nuevas drogas. Varios autores ya han propuesto al pez cebra como un modelo para el análisis biológico de los efectos de diversas drogas como el alcohol y la cocaína, obteniendo resultados parecidos a los encontrados en ratones. Anichtchik y colaboradores (Anichtchik *et al.*, 2004, *J Neurochem.*, 88(2):443-453) han demostrado que la administración de neurotoxinas catecolaminérgicas al pez cebra produce alteraciones neuroquímicas y comportamentales. Además, el pez cebra es un organismo en el que se pueden realizar análisis químicos de moléculas de bajo peso molecular, evitando el efecto materno que puede alterar los resultados si el mismo análisis se realiza sobre animales con desarrollo intrauterino. Por ello, este modelo es adecuado para realizar ensayos preclínicos frente a agentes tóxicos, y puesto que los embriones modifican su comportamiento tras la ingesta de alcohol o cocaína, el pez cebra podría ser utilizado como modelo para el estudio del fenómeno de adicción.

15

20

25

30

Existen controversias sobre los mecanismos que subyacen a la aparición y el desarrollo de tolerancia y dependencia a drogas de abuso. Parece claro que es necesario desarrollar nuevos modelos que aporten información sobre estos desafortunados efectos secundarios desde el punto de vista molecular, estructural, celular y de comportamiento. En este sentido se han realizado estudios sobre los efectos de la adicción a diferentes drogas utilizando el pez cebra como sistema modelo (Ninkovic y Bally-Cuif, 2006, *Methods*, 39(3):262-274).

35

El pez cebra puede ser un buen modelo para el estudio de los agentes opioides, ya que actualmente, 38 años después del descubrimiento de los opioides endógenos, se conocen mejor sus funciones, aunque no se han podido establecer con certeza absoluta los
5 mecanismos endógenos que describen su funcionamiento, ni se ha podido definir la forma de controlar los efectos secundarios producidos por éstos, como son la tolerancia y dependencia a las drogas.

En concreto, es enorme la controversia existente en cuanto a los mecanismos intracelulares
10 que hacen posible, por un lado, el control del dolor crónico y por otro, la producción de dependencia de la droga utilizada como agente analgésico. Hasta el momento, los estudios realizados con otros modelos experimentales no han resuelto muchas de las discrepancias existentes.

15 Hasta el momento no se han generado anticuerpos contra los receptores opioides de pez cebra. Seguramente esto se debe a las dificultades que entraña la semejanza molecular entre los distintos subtipos de receptores opioides. Esta ausencia de herramientas en el estudio de los receptores opioides en el pez cebra lleva a la necesidad de generar anticuerpos específicos contra los distintos receptores Mu, Delta1a y Delta1b que permitan
20 profundizar en el conocimiento de sus funciones, que lleven a su vez a descubrir los mecanismos moleculares en los que estos agentes están involucrados.

Las ventajas que presenta el uso del pez cebra como modelo de investigación se encuentran limitadas por la escasa disponibilidad de anticuerpos que detecten las proteínas
25 de este animal. Considerando que la conservación entre las secuencias de proteínas homólogas de pez cebra y mamíferos no es muy alta, hace que la gran cantidad de anticuerpos disponibles para la mayor parte de las proteínas de mamíferos no funcionen en las proteínas homólogas del pez cebra, lo que limita los estudios en este modelo. La generación de anticuerpos específicos contra cada uno de los receptores opioides de pez
30 cebra permitiría la realización de estudios que hasta el momento no han sido posibles.

DESCRIPCION DE LA INVENCION

La presente invención proporciona anticuerpos específicos frente al receptor opioide Delta1b
35 de pez cebra, de ahora en adelante "anticuerpos de la invención", capaces de reconocer de

forma específica mediante, por ejemplo aunque sin limitarnos, técnicas de inmunohistoquímica, dicho receptor opioide. El anticuerpo de la invención no produce reactividad cruzada contra los distintos receptores opioides, reconociendo únicamente el receptor opioide tipo Delta1b contra el que ha sido generado pero no los otros miembros de esta familia de receptores.

Por lo tanto, se proporcionan anticuerpos que reconocen específicamente el receptor opioide tipo Delta1b de pez cebra que pueden ser utilizados mediante distintas técnicas para diferentes estudios. La gran especificidad de los anticuerpos obtenidos permitirá estudiar las diferentes funciones en las que este receptor está implicado.

El antígeno utilizado para la generación de estos anticuerpos se localiza en el extremo carboxilo-terminal de la secuencia aminoacídica del receptor opioide tipo Delta1b de pez cebra, debido a que es la región más divergente entre los distintos receptores opioides.

Por ello, un primer aspecto de la invención se refiere a un péptido aislado, de ahora en adelante "péptido de la invención", que consiste en la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 1. Este péptido corresponde a los últimos 30 aminoácidos del extremo C-terminal, residuos I344 a T373, del receptor opioide tipo Delta1b de pez cebra cuya secuencia aminoacídica se describe en la SEQ ID NO: 3.

El péptido de la presente invención puede ser sintetizado, por ejemplo, aunque sin limitarnos, *in vitro*. Por ejemplo, mediante la síntesis de péptidos en fase sólida o mediante aproximaciones de ADN recombinante. El péptido de la invención puede producirse recombinantemente, no sólo directamente sino como un polipéptido de fusión junto con un polipéptido heterólogo, el cual puede contener, por ejemplo aunque sin limitarnos, una secuencia señal o puede ser otro polipéptido, por ejemplo, aunque sin limitarnos GST (del inglés, "Glutathione S-transferase"), que facilite su aislamiento y purificación. Este polipéptido fusionado al péptido de la invención puede comprender además un sitio de corte para una proteasa, por ejemplo, aunque sin limitarnos, en el extremo N-terminal de la proteína madura o del polipéptido.

Debido a la degeneración del código genético, en el cual diversos tripletes de nucleótidos dan lugar a un mismo aminoácido, existen diversas secuencias de nucleótidos que dan lugar a una misma secuencia aminoacídica. Por ello, otro aspecto de la invención se refiere a un

polinucleótido aislado, de ahora en adelante “polinucleótido de la invención”, que codifica para el péptido de la invención.

5 Los términos “secuencia nucleotídica”, “secuencia de nucleótidos”, “ácido nucleico”, “oligonucleótido” y “polinucleótido” se usan aquí de manera intercambiable y se refieren a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud que pueden estar o no, química o bioquímicamente modificados. Se refieren, por tanto, a cualquier polirribonucleótido o polidesoxirribonucleótido, tanto de cadena sencilla como de doble hebra.

10 El polinucleótido de la invención puede obtenerse de manera artificial mediante métodos de clonación y selección convencional, o mediante secuenciación.

15 El polinucleótido, adicionalmente a la secuencia codificante, puede llevar otros elementos, como por ejemplo aunque sin limitarse, intrones, secuencias no codificantes en los extremos 5' o 3', sitios de unión a ribosomas, o secuencias estabilizadoras. Estos polinucleótidos adicionalmente también pueden incluir secuencias codificantes para aminoácidos adicionales que puedan ser útiles, por ejemplo, aunque sin limitarse, para aumentar la estabilidad del péptido generado a partir de ellos o permitir una mejor purificación del mismo.

20 En una realización preferida de este aspecto de la invención, el polinucleótido de la invención consiste en la secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 2. Este polinucleótido corresponde a los nucleótidos 1122 a 1214 de la secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 4 codificante para el receptor opioide tipo Delta1b de pez cebra.

25 Otro aspecto de la invención se refiere a una construcción genética, de ahora en adelante “construcción genética de la invención”, que comprende el polinucleótido de la invención. El término “construcción genética” se refiere a una molécula de ADN o ARN en la que se puede integrar otro fragmento de ADN, sin que pierda la capacidad de autorreplicación. En una realización preferida, la construcción genética de la invención es un vector de expresión.

30 El término “vector de expresión”, tal y como se utiliza en la presente invención, se refiere a una molécula de DNA linear o circular que comprende el polinucleótido de la invención operativamente unido a nucleótidos adicionales necesarios para su expresión, como por ejemplo, aunque sin limitarnos, secuencias control tales como reguladores, terminadores y/o promotores. Ejemplos de vectores de expresión son, sin ningún tipo de limitación,
35 plásmidos, fagos, cósmidos, fagémidos, cromosomas artificiales de levaduras (YAC),

cromosomas artificiales de bacterias (BAC), cromosomas humanos artificiales (HAC), vectores virales, tales como adenovirus, retrovirus o cualquier otro tipo de molécula de DNA con capacidad para replicarse en el interior de una célula, procarionta o eucariota.

5 La expresión “unidos operativamente” se refiere a una yuxtaposición en la que los componentes así descritos tienen una relación que les permite funcionar en la manera intencionada. Una secuencia de control “unida de forma operativa” a un polinucleótido, está ligada de tal manera que la expresión de la secuencia codificante se consigue en condiciones compatibles con las secuencias de control.

10

El término “promotor” hace referencia a una región del ADN, generalmente “aguas arriba” o “upstream” del punto de inicio de la transcripción, que es capaz de iniciar la transcripción en una célula. Este término incluye, por ejemplo, pero sin limitarse, promotores constitutivos, promotores específicos de tipo celular o de tejido o promotores inducibles o reprimibles. Las secuencias de control dependen del origen de la célula en la que se quiere expresar el ácido nucleico. Ejemplos de promotores procariontas incluyen, por ejemplo, pero sin limitarnos, los promotores de los genes *trp*, *recA*, *lacZ*, *lacI*, *tet*, *gal*, *trc*, o *tac* de *E. coli*, o el promotor del gen α -amilasa de *B. subtilis*. Para la expresión de un ácido nucleico en una célula procarionta también es necesaria la presencia de un sitio de unión ribosomal situado “upstream” de la secuencia codificante. Secuencias de control apropiadas para la expresión de un polinucleótido en células eucariotas son conocidas en el estado de la técnica.

15

Dicha construcción genética de la invención puede ser introducida en una célula hospedadora de manera que se mantenga como una construcción genética integrada en el cromosoma o como un vector extracromosómico autoreplicante. Por ello, otro aspecto de la invención se refiere a una célula, de ahora en adelante “célula de la invención”, que comprende la construcción genética de la invención.

20

La célula de la invención puede ser cualquier tipo celular susceptible de transformación o transfección con la construcción genética de la invención para la expresión del péptido de la invención. Así, dicha célula puede ser eucariota o procarionta, preferiblemente procarionta y más preferiblemente *E. coli*.

25

Como se mostrará en los ejemplos, el péptido de la invención presenta capacidad antigénica y, por tanto, puede utilizarse como antígeno para desarrollar anticuerpos mono o

30

policlonales que se unan específicamente a él, lo cual puede llevarse a cabo mediante diversos métodos conocidos en el estado de la técnica. Por tanto, otro aspecto de la invención se refiere a un anticuerpo específico frente al péptido de la invención, “anticuerpo de la invención”.

5

El término “anticuerpo” se refiere a moléculas de inmunoglobulinas o a porciones inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulinas, es decir, moléculas que contienen un sitio de fijación de antígeno que se une específicamente (inmunorreacciona) con el péptido de la invención. Ejemplos de porciones de moléculas de inmunoglobulinas
 10 inmunológicamente activas incluyen fragmentos F(ab) y F(ab')₂, los cuales pueden ser generados, por ejemplo, aunque sin limitarnos, tratando el anticuerpo con una enzima tal como la pepsina o mediante técnicas de ingeniería genética conocidas en el estado de la técnica.

15

El anticuerpo de la invención puede ser policlonal (incluye típicamente anticuerpos distintos dirigidos contra determinantes o epítomos distintos) o monoclonal (dirigido contra un único determinante en el antígeno). La expresión “anticuerpo monoclonal” alude a una población de moléculas de anticuerpos que contienen solamente una especie de un sitio de fijación de antígeno capaz de inmunorreaccionar con un epítomo particular del antígeno. El anticuerpo
 20 monoclonal puede ser alterado bioquímicamente, mediante manipulación genética, o puede ser sintético, careciendo, posiblemente, el anticuerpo en su totalidad o en partes, de porciones que no son necesarias para el reconocimiento del péptido de la invención, y estando sustituidas por otras que comunican al anticuerpo propiedades ventajosas adicionales.

25

El anticuerpo de la invención también puede ser recombinante, quimérico, sintético o una combinación de cualquiera de los anteriores. Un “anticuerpo o polipéptido recombinante” (rAC) es un anticuerpo que ha sido producido en una célula hospedadora transformada o transfectada con el polinucleótido de la invención, con un ácido nucleico codificante para el
 30 anticuerpo de la invención, o que produce el anticuerpo de la invención o el péptido de la invención como resultado de la recombinación homóloga. Dicha célula hospedadora incluye una célula en un cultivo celular “in vitro” así como una célula en un animal hospedador.

35

El anticuerpo de la invención también puede ser quimérico. Así, una región de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes en anticuerpos

procedentes de una especie determinada o pertenecientes a una clase o subclase de anticuerpos determinados, mientras que la(s) cadena(s) restante(s) es(son) idéntica(s), u homóloga(s), a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otras especies o pertenecientes a otra clase o subclase de anticuerpos, así como a fragmentos de dichos anticuerpos, de manera que exhiban la actividad biológica deseada.

La expresión “anticuerpo específico frente al péptido de la invención” se refiere a que el anticuerpo de la invención reconoce el péptido de la invención y, por tanto, el receptor opioide tipo Delta1b de *Danio rerio*, específicamente, sin ser capaz de reconocer el resto de los receptores opioides de *Danio rerio*, tales como los receptores kappa, delta1a o mu. Es decir, el anticuerpo de la invención no presenta reactividad cruzada contra el resto de los receptores opioides.

“*Danio rerio*” o “pez cebra” o “Danio cebra” es un ciprínido emparentado con las carpas y balbos, originario del sudeste asiático, de uso frecuente en acuarios así como para investigación científica. Son peces alargados, fusiformes, con una única aleta dorsal, boca dirigida hacia arriba y un par de finas barbillas. El color de fondo es dorado o plateado, sobre los flancos y longitudinalmente se presentan de 5 a 9 bandas de color azul oscuro que comienzan detrás del opérculo y llegan hasta el final del animal (incluyendo la cola), dándole un aspecto cebrado del que toma el nombre. El opérculo es azulado y la zona ventral de un tono blanquecino rosado.

Como se ha explicado, el péptido de la invención es capaz de desencadenar una respuesta inmunitaria en un organismo al que le ha sido administrado, por lo que dicho péptido puede ser utilizado como antígeno para la generación de anticuerpos capaces de unirse a él. Por ello, otro aspecto de la invención se refiere al uso del péptido de la invención para la generación de anticuerpos específicos frente al receptor opioide tipo Delta1b de *Danio rerio*.

Uno de los métodos que podría llevarse a cabo para obtener el anticuerpo de la invención consiste, por ejemplo, aunque sin limitarnos, en la inmunización de animales con el péptido de la invención y la posterior purificación de los anticuerpos específicos frente al mismo presentes en su suero.

Por ello, otro aspecto de la invención se refiere a un método de obtención de anticuerpos policlonales específicos frente al receptor opioide tipo Delta1b de *Danio rerio*, de ahora en adelante “primer método de la invención”, que comprende:

- 5 a. Obtener el suero previamente extraído de un mamífero inmunizado con el péptido de la invención, y
- b. Purificar los anticuerpos policlonales frente al receptor opioide tipo Delta1b de *Danio rerio* presentes en el suero obtenido en la etapa (a).

10 El mamífero al que se refiere la etapa (a) del primer método de la invención puede ser, aunque sin limitarnos, conejo, pollo, roedores como el ratón, cerdo, caballo, oveja o cabra. En una realización preferida del primer método de la invención, el mamífero es un conejo.

El protocolo de inmunización se puede realizar por métodos convencionales, es decir, administrando al animal a inmunizar una primera dosis, preferiblemente de entre 0,2 y 1 mg, 15 más preferiblemente de 0,5 mg, del péptido de la invención, preferiblemente seguida de sucesivos refuerzos en días posteriores. Estas dosis de refuerzo pueden ser, por ejemplo aunque sin limitarnos, de entre 0,2 y 1 mg, preferiblemente de 0,25 mg, de péptido de la invención. Las dosis de refuerzo pueden ser una o varias, siendo preferiblemente varias y más preferiblemente en los días 14, 28, 49, 70 y 91 después de la primera inmunización. 20 Las inmunizaciones con el péptido de la invención se llevan a cabo preferiblemente en presencia de un adyuvante, el cual es una sustancia que cuando se mezcla con el antígeno y se inyecta con él mejora la inmunogenicidad del mismo. Los adyuvantes para los protocolos de inmunización son conocidos en el estado de la técnica, ejemplos de ellos son: adyuvante completo de Freund, adyuvante incompleto de Freund, alúmina, 25 polirribonucleótidos sintéticos, lipopolisacárido bacteriano (LPS) o liposomas. Preferiblemente, el adyuvante empleado en la primera inmunización es adyuvante completo de Freund y el adyuvante empleado en las inmunizaciones de refuerzo es adyuvante incompleto de Freund. Las inmunizaciones se pueden llevar a cabo por vía oral o parenteral. Ejemplos de vía parenteral son, aunque sin limitarnos, intravenosa, intradérmica, 30 subcutánea, intramuscular o intraperitoneal. Preferiblemente, el protocolo de inmunización es el que se describe en los ejemplos de la presente invención y puede ser llevado a cabo por un técnico sin formación médica específica.

En otra realización preferida, el péptido de la invención empleado para la inmunización del 35 mamífero se ha producido recombinantemente. Dicha producción recombinante comprende

la amplificación del polinucleótido de la invención, clonación del polinucleótido amplificado en un vector de expresión, transformación o transfección de una célula competente con dicho vector, cultivo de dicha célula en condiciones que promuevan la expresión del péptido de la invención y aislamiento y purificación del péptido de la invención producido por la
5 célula.

Una vez producida la inmunización, se extrae el suero del animal inmunizado con el péptido de la invención. La extracción del suero se puede llevar a cabo mediante, por ejemplo aunque sin limitarnos, extracción sanguínea, posterior coagulación de ésta, eliminación del coágulo de fibrina y otros componentes y aislamiento del suero. Para obtener el suero, a la
10 sangre no se le aplica anticoagulante, sino que se deja que coagule y se centrifuga. En la presente invención el suero se extrae, preferiblemente, en los días 38, 59, 80 y/o 101 tras la primera inmunización. Se entiende por “suero”, “suero sanguíneo” o “suero hemático” el componente de la sangre resultante tras permitir la coagulación de ésta y eliminar el coágulo de fibrina y otros componentes, que contiene numerosos efectores biológicos, como el factor
15 de crecimiento derivado de plaquetas, segregados por los elementos formes al suceder dicha coagulación. Es de un color amarillo, un poco más intenso que el plasma.

Posteriormente, se purifican los anticuerpos específicos frente al receptor opioide tipo Delta1b de *Danio rerio* presentes en el suero obtenido en la etapa (a) del primer método de
20 la invención. Son conocidos en el estado de la técnica diversos métodos de purificación de anticuerpos que podrían llevarse a cabo en la etapa (b) del primer método de la invención, como por ejemplo, aunque sin limitarnos, métodos electroforéticos o cromatográficos.

La “electroforesis” es una técnica analítica de separación basada en el movimiento o la migración de macro-moléculas disueltas en un medio (*buffer* de electroforesis), mediante una matriz o un sólido apoyo como resultado de la acción de un campo eléctrico. El comportamiento de la molécula depende de su movilidad electroforética y esta movilidad depende de la carga, tamaño y forma. Existen numerosas variaciones de esta técnica basadas en el equipamiento usado, soportes y condiciones para llevar a cabo la separación
25 de las moléculas. La electroforesis se selecciona de la lista que consiste en, pero sin limitarse, electroforesis capilar, electroforesis en papel, electroforesis en gel de agarosa, electroforesis en gel de poliacrilamida, isoelectroenfoque o electroforesis bidimensional.

Los “métodos cromatográficos” permiten la separación de las moléculas por, aunque sin
35 limitarse, su carga, tamaño, masa molecular, mediante su polaridad o mediante su potencial

redox. La técnica de cromatografía se selecciona de entre, pero sin limitarse, cromatografía de partición, filtración, cromatografía de adsorción, cromatografía de exclusión molecular, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía hidrofóbica o cromatografía de afinidad, y pueden realizarse tanto en columna, como en papel o en placa. Preferiblemente, la purificación de los anticuerpos en el paso (b) del primer método de la invención se lleva a cabo mediante columna de afinidad, más preferiblemente de agarosa, donde el péptido de la invención de SEQ ID NO: 1 o el receptor tipo Delta1b de *Danio rerio* de SEQ ID NO: 3 se ha fijado en dicha columna de manera que los anticuerpos específicos frente al receptor opioide tipo Delta1b de *Danio rerio* se queden unidos a ellos cuando el suero obtenido se pase a través de la columna. Posteriormente, dichos anticuerpos unidos se eluyen de la columna mediante métodos de elución conocidos en el estado de la técnica.

Otro aspecto de la invención se refiere al suero que comprende anticuerpos policlonales específicos frente al receptor opioide tipo Delta1b de *Danio rerio* obtenible en la etapa (a) del primer método de la invención. A este suero también se hará referencia como “suero de la invención”. Dicho suero comprende uno o más anticuerpos policlonales específicos frente al antígeno o péptido de la invención.

Otra realización preferida se refiere al anticuerpo de la invención donde dicho anticuerpo es policlonal y ha sido obtenido mediante el primer método de la invención.

Los ejemplos de la presente invención demuestran que el anticuerpo de la invención, preferiblemente policlonal y obtenido mediante el primer método de la invención, presenta especificidad frente al péptido de la invención, es decir, frente a la región C-terminal del receptor opioide tipo Delta1b de *Danio rerio*, la cual corresponde a los últimos 30 aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, siendo por tanto capaz de detectar dicho receptor mediante, por ejemplo aunque sin limitarnos, técnicas inmunohistoquímicas. Por ello, otro aspecto de la invención se refiere al uso del suero de la invención o del anticuerpo de la invención para la detección del receptor opioide tipo Delta1b de *Danio rerio*. En una realización preferida, dicha detección se lleva a cabo mediante un ensayo inmunohistoquímico.

Un “inmunoensayo” o “ensayo inmunohistoquímico” es una prueba bioquímica que detecta y/o mide la concentración de un péptido en una muestra, preferiblemente biológica aislada, usando la reacción de un anticuerpo o anticuerpos con alguno de sus antígenos. El ensayo

aprovecha la especificidad de un anticuerpo con su antígeno. La cantidad de antígeno puede detectarse por medio de métodos conocidos en el estado de la técnica. Uno de los métodos más comunes es el que se basa en el marcaje del antígeno o de los anticuerpos. El marcaje puede llevarse a cabo, pero sin limitarse, con una enzima, radioisótopos (radioinmunoensayo), etiquetas magnéticas (inmunoensayo magnético) o fluorescencia, y también otras técnicas incluidas aglutinación, nefelometría, turbidimetría o Western Blot. Los inmunoensayos heterogéneos pueden ser competitivos o no competitivos. El inmunoensayo puede ser competitivo: la respuesta será inversamente proporcional a la concentración de antígeno en la muestra, o puede ser no competitivo (conocido también como "sandwich assay"): los resultados son directamente proporcionales a la concentración del antígeno. Una técnica de inmunoensayo que puede ser utilizada en la presente invención es el ensayo ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*). En una realización más preferida, el ensayo inmunohistoquímico se selecciona de la lista que consiste en: Western blot, ELISA o inmunofluorescencia.

15

Otro aspecto de la invención se refiere a un kit, de ahora en adelante "kit de la invención", para la detección del receptor opioide tipo Delta1b de *Danio rerio* que comprende el anticuerpo de la invención.

20 El kit de la invención puede comprender además, sin ningún tipo de limitación, sondas, tampones, enzimas, agentes para prevenir la contaminación, etc. Por otro lado el kit puede incluir todos los soportes y recipientes necesarios para su puesta en marcha y optimización. El kit puede contener además otras proteínas, incluyendo anticuerpos o antígenos, que sirvan como controles positivos y negativos. Preferiblemente, este kit comprende además las instrucciones para llevar a cabo la detección del receptor opioide tipo Delta1b de *Danio rerio*, preferiblemente mediante un ensayo inmunohistoquímico, más preferiblemente mediante ELISA, Western blot o inmunofluorescencia.

Opcionalmente, el anticuerpo de la invención en el kit de la invención está marcado o inmovilizado.

El término "marcado", tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a que el anticuerpo está conjugado con una etiqueta. Son conocidos en el estado de la técnica un elevado número de etiquetas que pueden ser conjugadas a un anticuerpo. Ejemplos de etiquetas que pueden ser empleadas para marcar un anticuerpo son, pero sin limitarnos,

radioisótopos (por ejemplo, ^{32}P , ^{35}S o ^3H), marcadores fluorescentes o luminiscentes [por ejemplo, fluoresceína (FITC), rodamina, *texas red*, ficoeritrina (PE), aloficocianina, 6-carboxifluoresceína (6-FAM), 2',7'-dimetoxi-4',5'-dicloro-6-carboxifluoresceína (JOE), 6-carboxi-X-rodamina (ROX), 6-carboxi-2',4',7',4,7-hexaclorofluoresceína (HEX), 5-carboxifluoresceína (5-FAM) o N,N,N',N'-tetrametil-6-carboxirodamina (TAMRA)]; anticuerpos, fragmentos de anticuerpos [por ejemplo, fragmentos F(ab)2], etiquetas de afinidad [por ejemplo, biotina, avidina, agarosa, proteína morfogenética del hueso (BMP), haptenos], enzimas o sustratos de enzimas [por ejemplo, fosfatasa alcalina (AP) y peroxidasa de rábano picante (HRP)].

10

El término "inmovilizado", tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a que el anticuerpo de la invención puede ser unido a un soporte sin perder su actividad. Preferiblemente, el soporte puede ser la superficie de una matriz, (por ejemplo, una matriz de nylon), una placa de microvaloración (por ejemplo, de 96 pocillos) o soporte de plástico similar, o bien cuentas (*esferas*, por ejemplo, *esferas* de agarosa o microesferas pequeñas superparamagnéticas compuestas de matrices biodegradables).

15

Otro aspecto de la invención se refiere al uso del kit de la invención para la detección del receptor opioide tipo Delta1b de *Danio rerio*.

20

Otro aspecto de la invención se refiere a un método de detección del receptor opioide tipo Delta1b de *Danio rerio*, de ahora en adelante "segundo método de la invención", que comprende:

25

- a. Poner en contacto una muestra biológica aislada con el anticuerpo de la invención,
- b. incubar la muestra biológica aislada y el anticuerpo del paso (a) durante un periodo de tiempo adecuado para que tenga lugar una respuesta inmunológica, y
- c. determinar la presencia de respuesta inmunológica tras la incubación del paso (b).

30

El anticuerpo empleado en el segundo método de la invención puede estar marcado o inmovilizado. La ventaja de usar anticuerpos marcados o inmovilizados con respecto a usarlos sin marcar o inmovilizar es que facilitan su adaptación a técnicas estándar de aislamiento y que pueden emplearse con equipamiento estándar. Por tanto, en una realización preferida del segundo método de la invención, el anticuerpo de la invención empleado en la etapa (a) está marcado o inmovilizado.

35

En una realización más preferida del segundo método de la invención, el anticuerpo de la invención empleado en la etapa (a) está marcado y además uniformemente; la ventaja de marcar uniformemente los anticuerpos es que todos los anticuerpos pueden ser detectados a la vez. En una realización aun más preferida, el anticuerpo de la invención empleado en la etapa (a) está marcado con una etiqueta seleccionada de la lista que consiste en: un radioisótopo, un marcador fluorescente o luminiscente, un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, una etiqueta de afinidad, una enzima y un substrato de una enzima.

10 En una realización más preferida del segundo método de la invención, el anticuerpo de la invención empleado en la etapa (a) esta inmovilizado en un soporte seleccionado de la lista que consiste en: una matriz de nylon, en un soporte de plástico o en cuentas.

Se entiende por "muestra biológica" cualquier muestra obtenida de tejidos y/o fluidos biológicos, preferiblemente procedentes de *Danio rerio*, o cultivos celulares procedentes de células eucariotas o procariotas donde se desea conocer si se expresa o no el receptor tipo Delta1b de *Danio rerio*. La muestra biológica podría ser, por ejemplo, pero sin limitarse, fresca, congelada, fijada o fijada y embebida en parafina.

20 La incubación del anticuerpo de la invención con la muestra biológica aislada se realiza bajo condiciones que permiten la formación de complejos antígeno-anticuerpo y se mantiene durante un periodo de tiempo adecuado para que tenga lugar una respuesta inmunológica.

La presencia de dicha respuesta inmunológica puede determinarse por métodos convencionales conocidos en el estado de la técnica, como por ejemplo, aunque sin limitarnos, mediante ensayos inmunohistoquímicos. Por ello, en una realización preferida, la presencia de respuesta inmunológica en el paso (c) del segundo método de la invención se determina mediante un ensayo inmunohistoquímico. En una realización más preferida, el ensayo inmunohistoquímico se selecciona de la lista que consiste en: Western blot, ELISA o inmunofluorescencia.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los

siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

5

Figura 1. Muestra cómo el anticuerpo generado (WB: Delta1b) reconoce específicamente el receptor opioide tipo Delta1b de pez cebra. (A) Análisis de tipo Western blot con el anticuerpo purificado reconociendo el antígeno utilizado para su generación pero no otros antígenos (Mu y D1a). (B) Análisis de tipo Western blot con el anticuerpo purificado reconociendo el receptor opioide tipo Delta1b expresado en células HEK293 pero no otros receptores opioides (Mu y D1a). La expresión de los receptores opioides en las células HEK293 fue confirmada con anticuerpos Flag, ya que cada secuencia codificante para los receptores opioides llevaba acoplada en el extremo amino-terminal la secuencia del epítipo Flag.

15

Figura 2. Muestra cómo el anticuerpo generado reconoce específicamente el receptor correspondiente mediante inmunohistoquímica y con un patrón similar al de la expresión del ARNm codificante. Las fotos (a) y (b) muestran la tinción de embriones de pez cebra incubados con IgG purificadas de conejo, anticuerpos Delta1b. Las fotos (a') y (b') muestran una ampliación de las fotos (a) y (b). La foto (c) muestra la tinción con los anticuerpos Delta1b en embriones inyectados con morfolinis contra el gen Delta1b. La tinción de esta foto está muy reducida con respecto a la foto (b) debido a la reducción en los niveles de la proteína correspondiente, lo que indica la especificidad en las tinciones de los anticuerpos. El panel (d) muestra el patrón de expresión del ARNm correspondiente al receptor Delta1b. La foto (d') muestra una ampliación de la foto (d).

25

EJEMPLOS

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que demuestran la eficacia del anticuerpo de la invención para la detección específica del receptor opioide tipo Delta1b de *Danio rerio*. Estos ejemplos específicos que se proporcionan sirven para ilustrar la naturaleza de la presente invención y se incluyen solamente con fines ilustrativos, por lo que no han de ser interpretados como limitaciones a la invención que aquí se reivindica. Por tanto, los ejemplos descritos más adelante muestran la invención sin limitar el campo de aplicación de la misma.

35

Ejemplo 1. Producción de anticuerpos policlonales específicos frente al receptor opioide tipo Delta1b de *Danio rerio*.

Plásmidos

5

El fragmento de ADN de SEQ ID NO: 2 correspondiente a los nucleótidos 1122-1214 de la secuencia codificante para el receptor opioide Delta1b de SEQ ID NO: 4, fue amplificado a partir de cDNA de pez cebra mediante la reacción de PCR utilizando oligonucleótidos flanqueados por secuencias EcoRI y XhoI y clonado en el plásmido pGEX-P 6-1. Cuando este plásmido se expresó en las bacterias en presencia de IPTG (0,1 mM) se generaron proteínas recombinantes que constaban de GST con los últimos 30 aminoácidos (I344-T373, SEQ ID NO: 1) del receptor opioide Delta1b de SEQ ID NO: 3. El cDNA completo del receptor opioide Delta1b de pez cebra fue amplificado a partir de cDNA por la reacción de PCR utilizando oligonucleótidos flanqueados por secuencias NotI y XhoI y clonado en el plásmido pFlag-CMV-1. Todas las construcciones fueron verificadas mediante secuenciación.

10

15

Transfecciones de DNA

Las células HEK293 fueron realizadas mediante el método de fosfato de calcio como se ha descrito anteriormente (Arévalo *et al.*, 2001, *Oncogene* 20 (10):1229-1234).

20

Análisis de Western blot

Se realizaron análisis de Western blot, como se han descrito previamente (Yu *et al.*, 2011, *Traffic* 12(4):521-534).

25

Producción de la proteína recombinante

La producción de la proteína recombinante (SEQ ID NO: 1) fusionada a GST se realizó en bacterias *E. coli* DH5 α . Las bacterias transformadas con el plásmido correspondiente fueron inoculadas en medio LB suplementado con ampicilina (100 μ g/ml) durante toda la noche a 37°C. A la mañana siguiente, el cultivo se diluyó 1/100 con medio fresco para que creciese a 37°C hasta fase exponencial (OD₆₀₀≈0.4-0.6), momento en el que se indujo la expresión de la proteína recombinante con IPTG (0,1 mM) durante 3 horas. Las bacterias se recogieron y

30

35

resuspendieron en una solución fría que contenía PBS, lisozima e inhibidores de proteasas para ser homogeneizadas mediante sonicación. Posteriormente, se añadió Tritón X-100 a la solución sonicada y se centrifugó para eliminar los desechos. El sobrenadante se incubó durante toda la noche a 4°C con una agarosa que contiene glutatión lo que permite la unión de la GST de la proteína recombinante. Después de lavar extensamente con PBS frío, la proteína recombinante se eluyó de la agarosa con un solución de glicina 0,1M pH 2.5 para después neutralizarse con 1M Tris pH9.5 y añadir NaCl a una concentración final de 20 mM. Para generar columnas de afinidad para purificar los anticuerpos, la proteína recombinante unida a la agarosa con glutatión se unió covalentemente con DSP siguiendo las instrucciones del fabricante.

Inmunización de conejos

Los conejos fueron inmunizados inicialmente con 0,5 mg de proteína recombinante mezclada con adyuvante completo de Freund. Las dosis de refuerzo se realizaron con 0,25 mg de proteína recombinante mezclada con adyuvante de Freund incompleto a los 14, 28, 49, 70 y 91 días después de la primera vacuna. Se recogieron sueros en los días 0 (pre-inmune), 38, 59, 80 y 101 después de la primera inmunización.

Purificación de anticuerpos

La proteína GST unida covalentemente a agarosa se utilizó como una columna de afinidad para eliminar los anticuerpos contra GST procedentes de los sueros obtenidos. La proteína recombinante GST-SEQ ID NO: 1 unida covalentemente a agarosa se utilizó como columna de afinidad para purificar los anticuerpos contra el receptor opioide Delta1b presente en los sueros en los que se habían eliminado los anticuerpos contra GST. Los anticuerpos unidos a la columna se eluyeron con una solución de glicina 0,1M pH 2.5. La solución de anticuerpos eluidos se neutralizó con 1M Tris pH9.5 y se añadió NaCl a una concentración final de 20 mM. Los anticuerpos purificados fueron cuantificados y utilizados para los distintos experimentos.

Inmunohistoquímica en embriones de pez cebra

Los embriones de pez cebra a 48 horas post fertilización se fijaron en 4% PFA. Después de lavarse extensamente con PBS, los embriones se incubaron en una solución que contiene

PBS, 5% de suero de cabra y 0,05% Tritón X-100 durante 1 hora para posteriormente añadir el anticuerpo correspondiente (2,5 µg/ml) durante 2 días a 4°C con agitación. Los embriones se lavaron tres veces con PBS, se incubaron con un anticuerpo anti-conejo biotinilado (1/500) durante 2 horas, se lavaron tres veces con PBS y finalmente se incubaron con solución de ABC (Vector) durante 30 minutos. Una vez más, se realizaron tres lavados con PBS y la tinción se reveló con el sustrato ImmPACT DAB (Vector). Las imágenes fueron tomadas con un microscopio AX70 de Olympus equipado con una cámara Olympus DP70.

Microinyección de morfolinos

10

Oligómeros antisentido morfolino (MOs) se usaron para la reducción del receptor opioide Delta1b (Gene Tools, LLC Philomath, OR). La secuencia utilizada para la reducción del receptor opioide Delta1b fue ZfDOR1b (SEQ ID NO: 5 GGAGGCTCCATTATGCTCGTCCCCT). Este MO se diluyó (en agua esterilizada) a una concentración de 0,3 mM y la concentración empleada para el receptor opioide fue 1 µM (ZfDOR1b). El grupo experimental de MO fue ZfDOR1b, y el grupo de control de MO fue microinyectado con una solución estándar de control de MO (SEQ ID NO: 6 CCTCTTACCTCAGTTACAATTTATA).

20 Aproximadamente, 3nl del MO se microinyectaron en los sacos vitelinos de los embriones de pez cebra en la etapa de una a cuatro células según protocolos publicados con un sistema de micromanipulador-microinyector de Eppendorf AG (Hamburgo, Alemania).

Hibridación *in situ* de embriones de pez cebra

25

Embriones de 48 hpf se fijaron con 4% paraformaldehído (PFA) en PBS durante toda la noche a 4°C, se lavaron dos veces con PBS durante 5 min a temperatura ambiente y finalmente se mantuvieron en metanol absoluto a -20°C hasta su uso. Al día siguiente, los embriones se rehidrataron en diluciones consecutivas de metanol/PBS (75, 50 y 25%) durante 5 min para cada dilución y posteriormente se lavaron 4 veces durante 5 minutos en una solución que contenía PBS y 0,2% Tween 20 (PBT). Para permeabilizar los embriones se empleó proteinasa K (10 µg/ml) durante 40 min. La digestión de la proteinasa K se detuvo mediante la adición de PBS con 4% PFA a los embriones durante 20 minutos y los restos de PFA se eliminaron mediante cuatro lavados de 5 min por lavado con PBT. Después de 2h de prehibridación los embriones se hibridaron durante la noche a 64°C con las sondas para

35

ZfDOR1b. Se realizaron lavados con solución salina prehibridación/Tris-buffered (TBS) (50% / 50%) y TBS-Tween 20 (0,2%) (TBST) durante 2 horas. Luego, los embriones se incubaron con tampón de bloqueo (suero de cabra + TBST) durante 2 horas y se incubaron durante toda la noche con un anticuerpo anti-digoxigenina conjugado con fosfatasa alcalina (1:3000, Roche) a 4°C. Al día siguiente, los embriones se lavaron con una solución de Xpho (1 M Tris HCl, pH 9.5, 1 MgCl₂ M, 4 M de NaCl y 20% Tween-20) durante 1 hora y finalmente la hibridación se reveló con una solución BCIP/NBT (Roche).

Ejemplo 2. Especificidad de los anticuerpos policlonales generados frente al receptor opioide tipo Delta1b de *Danio rerio*.

Se eligió el extremo carboxilo-terminal, últimos 30 aminoácidos, del receptor opioide tipo Delta1b de SEQ ID NO: 3 para usar como antígeno para generar anticuerpos específicos contra dicho receptor opioide expresado en pez cebra.

Se generaron construcciones fusionadas a GST con la secuencia codificante para los últimos 30 aminoácidos del receptor opioide Delta1b (SEQ ID NO: 2) para producir la proteína recombinante en bacterias. Esta proteína fue purificada y utilizada como antígeno para inmunizar conejos del modo descrito en el ejemplo 1. Los sueros obtenidos de los conejos se incubaron con una columna de afinidad hecha con GST para eliminar los anticuerpos generados contra GST. Una vez eliminados estos anticuerpos, el suero se incubó con la columna de afinidad correspondiente generada con la proteína recombinante GST-antígeno (GST-SEQ ID NO: 1). De esta manera se purificaron y cuantificaron los anticuerpos contra Delta1b, para posteriormente probar su capacidad de reconocimiento del antígeno correspondiente. Para ello, 0,5 µg de la proteína recombinante utilizada como antígeno (SEQ ID NO: 1) se utilizaron para realizar ensayos de western blot. Como control negativo se utilizó una proteína de fusión GST que contiene el dominio WW de Nedd4-2. La incubación de los anticuerpos purificados con las membranas de western blot dio como resultado el reconocimiento del antígeno específico Delta1b y no de los otros (Fig. 1A).

Para comprobar si los anticuerpos generados eran capaces de unirse al receptor opioide de pez cebra, se expresó cada receptor opioide (Mu, Delta1a y Delta1b) en las células HEK293 y los lisados se utilizaron para ensayos de western blot. Los anticuerpos generados fueron capaces de reconocer el receptor opioide Delta1b y no los otros (Fig. 1B, panel de la izquierda). La expresión de los receptores opioides en las células HEK293 fue confirmada con anticuerpos Flag, ya que cada secuencia codificante para los receptores opioides

llevaba acoplada en el extremo amino-terminal la secuencia del epítipo Flag (Fig. 1B, panel de la derecha). Por lo tanto, se generaron anticuerpos contra el receptor opioide Delta1b que funcionan en western blot y presentan una gran especificidad para este receptor.

- 5 Para evaluar si los anticuerpos generados reconocían mediante inmunohistoquímica el receptor opioide Delta1b de pez cebra, se obtuvieron embriones de 48 hpf. Los embriones se procesaron e incubaron con los anticuerpos según se describe en el ejemplo 1. Así se observó que todos los anticuerpos reconocieron el receptor endógeno tipo Delta1b (Fig. 2, panel b y ampliado en b') con un patrón similar al obtenido mediante técnicas de hibridación
- 10 *in situ* (Fig. 2, panel d y ampliado en d'). Como control, el uso de IgGs purificadas de conejos no generó ninguna señal (Fig. 2, panel a y ampliado a'). Finalmente, para confirmar que la señal obtenida era específica para el receptor opioide Delta1b y no para otra proteína, se procedió a eliminar en embriones de pez cebra la expresión del receptor opioide Delta1b mediante el uso de morfolinós específicos para luego utilizarlos en inmunohistoquímica. La
- 15 incubación de estos embriones que no expresaban el receptor opioide Delta1b con el anticuerpo correspondiente no generó ninguna señal (Fig. 2, panel c). Todos estos datos indicaron que los anticuerpos generados reconocen mediante técnicas de inmunohistoquímica el receptor opioide Delta1b de forma específica.

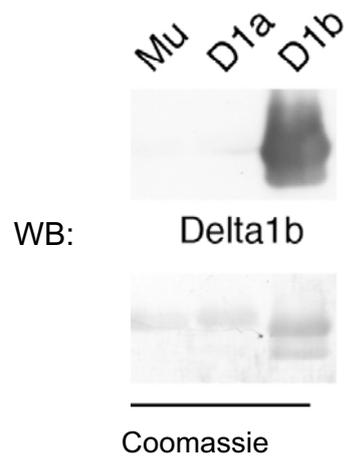
REIVINDICACIONES

1. Péptido aislado que consiste en la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 1.
- 5 2. Polinucleótido aislado que codifica para el péptido según la reivindicación 1.
3. Polinucleótido según la reivindicación 2 que consiste en la secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 2.
- 10 4. Construcción genética que comprende el polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 2 ó 3.
5. Construcción genética según la reivindicación 4 que es un vector de expresión.
- 15 6. Célula que comprende la construcción genética según cualquiera de las reivindicaciones 4 ó 5.
7. Método de obtención de anticuerpos policlonales específicos frente al receptor opioide tipo Delta1b de *Danio rerio* que comprende:
20 a. obtener el suero previamente extraído de un mamífero inmunizado con el péptido según la reivindicación 1, y
b. purificar los anticuerpos policlonales frente al receptor opioide tipo Delta1b de *Danio rerio* presentes en el suero obtenido en la etapa (a).
- 25 8. Método según la reivindicación 7 donde el mamífero es un conejo.
9. Suero que comprende anticuerpos policlonales específicos frente al receptor opioide tipo Delta1b de *Danio rerio* obtenible por el método según cualquiera de las reivindicaciones
30 7 u 8.
10. Anticuerpo específico frente al péptido según la reivindicación 1.
- 35 11. Anticuerpo según la reivindicación 10, donde el anticuerpo es policlonal y ha sido obtenido mediante el método según cualquiera de las reivindicaciones 7 u 8.

12. Uso del suero según la reivindicación 9 o del anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 10 u 11 para la detección del receptor opioide tipo Delta1b de *Danio rerio*.
- 5 13. Uso según la reivindicación 12, donde la detección del receptor opioide tipo Delta1b de *Danio rerio* se lleva a cabo mediante un ensayo inmunohistoquímico.
14. Uso según la reivindicación 13, donde el ensayo inmunohistoquímico se selecciona de la lista que consiste en: Western blot, ELISA o inmunofluorescencia.
- 10 15. Kit para la detección del receptor opioide tipo Delta1b de *Danio rerio* que comprende el anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 10 u 11.
16. Uso del kit según la reivindicación 15 para la detección del receptor opioide tipo Delta1b de *Danio rerio*.
- 15 17. Método de detección del receptor opioide tipo Delta1b de *Danio rerio* que comprende:
- 20 a. poner en contacto una muestra biológica aislada con el anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 10 u 11,
- b. incubar la muestra biológica aislada y el anticuerpo del paso (a) durante un periodo de tiempo adecuado para que tenga lugar una respuesta inmunológica, y
- c. determinar la presencia de respuesta inmunológica tras la incubación del paso (b).
- 25 18. Método según la reivindicación 17, donde la presencia de respuesta inmunológica en el paso (c) se determina mediante un ensayo inmunohistoquímico.
- 30 19. Método según la reivindicación 18, donde el ensayo inmunohistoquímico se selecciona de la lista que consiste en: Western blot, ELISA o inmunofluorescencia.

FIG. 1

A



B

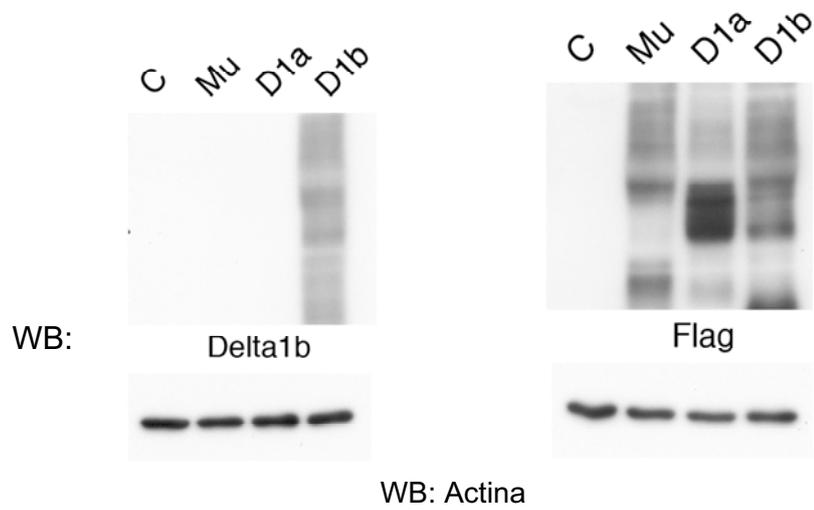
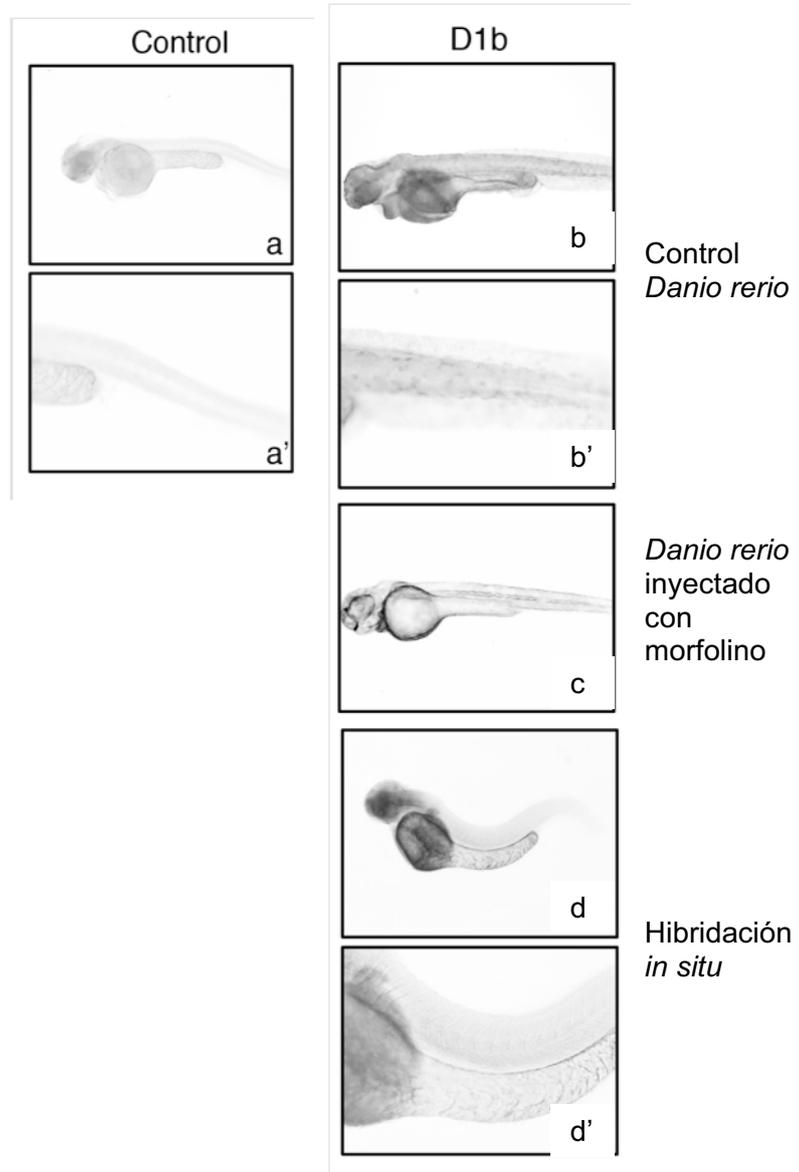


FIG. 2



ES 2 486 116 A1

Val Val Gly Leu Val Gly Asn Val Leu Val Met Tyr Gly Val Val Arg
 65 70 75 80
 Tyr Thr Lys Met Lys Thr Ala Thr Asn Ile Tyr Ile Phe Asn Leu Ala
 85 90 95
 Leu Ala Asp Ala Leu Ala Thr Ser Thr Leu Pro Phe Gln Ser Ala Lys
 100 105 110
 Tyr Leu Met Gly Thr Trp Pro Phe Gly Glu Leu Leu Cys Lys Val Val
 115 120 125
 Ile Ala Ile Asp Tyr Tyr Asn Met Phe Thr Ser Ile Phe Thr Leu Thr
 130 135 140
 Met Met Ser Val Asp Arg Tyr Ile Ala Val Cys His Pro Val Arg Ala
 145 150 155 160
 Leu Asp Phe Arg Thr Pro Val Lys Ala Lys Ile Ile Asn Ile Cys Val
 165 170 175
 Trp Ile Leu Ser Ser Ala Val Gly Phe Pro Val Met Val Met Ala Val
 180 185 190
 Thr Lys Glu Leu Asp Ser Gly Lys Thr Ile Cys Met Leu Lys Phe Pro
 195 200 205
 Asp Pro Glu Trp Tyr Trp Asp Thr Val Thr Lys Ile Cys Val Phe Ile
 210 215 220
 Phe Ala Phe Val Phe Pro Val Leu Val Ile Thr Val Cys Tyr Gly Leu
 225 230 235 240
 Met Ile Leu Arg Leu Lys Ser Val Arg Leu Leu Ser Gly Ser Lys Glu
 245 250 255
 Lys Asp Arg Asn Leu Arg Arg Ile Thr Arg Cys Phe Ser Gly Gly Gly
 260 265 270
 Ala Phe Ile Ile Cys Trp Thr Pro Ile His Ile Phe Ile Ile Val Lys
 275 280 285
 Thr Val Val Glu Ile Asp Gln Lys Asn Leu Leu Val Val Ala Cys Trp
 290 295 300
 His Leu Cys Ile Ala Leu Gly Tyr Met Asn Ser Ser Leu Asn Pro Val
 305 310 315 320
 Leu Tyr Ala Phe Leu Asp Glu Asn Phe Lys Arg Cys Phe Arg Glu Phe
 325 330 335

ES 2 486 116 A1

Cys Leu Pro Phe Arg Thr Arg Ile Glu Gln Asn Ser Phe Ser Lys Ala
 340 345 350

Arg Ser Val Ile Arg Glu Pro Ile Ser Val Cys Ala Lys Thr Glu Ser
 355 360 365

Ile Lys Gln Pro Thr
 370

<210> 4
 <211> 2364
 <212> DNA
 <213> Danio rerio

<400> 4
 atgatcttac acctttcatt ttaaacaac actttcaaca ttttacagtt tcacttaatt 60
 agaaggcggt cgacatatag gggacgagca taatggagcc tccaacagtg actgtcagcg 120
 atttttccga gcgttatcct ttattttctgc acaactcgag ctttctggag gagcctgcgg 180
 acttctgtcc aactggagcg gaggaagcag tagctgaagg cggtgagagg cagcagtgcg 240
 gcgttatcgc tgtctccatc actgcgctat actcggctcat ctgcgttgtg ggactcgttg 300
 gaaatgtgtt ggttatgtac ggagtgggtca ggtacacgaa gatgaaaacg gcaaccaaca 360
 tatacatctt caacctggca ttagcagatg cgttggccac cagtacattg cccttccaga 420
 gcgcxaaata cctcatgggc acctggccgt tcggcgagct cttgtgtaaa gtggtcattg 480
 ctattgacta ttacaacatg tttaccagta ttttcacgct gacgatgatg agtgtggacc 540
 gctatattgc cgtgtgtcat ccggtgaggg ccctggactt ccgcacgcct gtcaaagcca 600
 agatcatcaa catctgcgtc tggattctgt cctccgctgt cggcttcccc gtcatggtga 660
 tggctgttac taaagaatta gactcaggca aaacaatctg catgctgaaa tccccgacc 720
 cagaatggta ctgggataca gtgaccaaaa tctgcgtttt ttttttgcc tttgtgtttc 780
 ccgtcctggg gatcaccgct tgctacggcc tgatgatcct gcggctgaag agcgtgcgcc 840
 tgctctccgg ctcaaagag aaggacagga acctccggcg catcaccga tgttttagtg 900
 gtgggtggcgc attcatcatc tgctggacct ccatccatc cttcatcatc gtcaagacag 960
 tggtagagat cgaccagaag aacctgctgg tggtagcctg ctggcatctg tgcacgctc 1020
 tgggctacat gaacagcagc ctcaaccggg tcctctacgc ctttctagat gagaacttca 1080
 agaggtgctt cagagagttc tgcttgacct ttcgactcg catagagcag aacagctttt 1140
 ccaaagcccc cagcgtcatc agagagccca tctctgtctg cgccaaaaca gaatcaatca 1200
 agcagcccac atgactagac ctggaccgga tgactcctag tacacagaaa gaccgcagt 1260
 ccgaggtaac ccagatctct acaactgagt tttaagctta tctggcccat aaactgctgg 1320
 cagaatgtca tgttggggca ttatttatat tttattctca tcgttcttga ctgaaaagta 1380
 tggatggccc tgaaatgatc tgcgagatat tttcctaagt gaggaaatga gatgatctgg 1440

ES 2 486 116 A1

accatcaaga tggtaatcat gcattggaaa agacatcaaa gacctgacca acaggaaatt 1500
 tacattcatt agcggtatat gagccaatac agcagattcc ctaatgagat ttttttttta 1560
 tattgcaagt taatgcattt ccatgggaat tgtgggaatt gtgggatttt atgatacatt 1620
 gaataatcaa ttctgctttt gaaacaacaa agtgagctgt aagatttttc ttacaagagc 1680
 ttgttacaca gaaaaatgaa aatgactctt tttgaagctc ctgttgtaga caataaaagt 1740
 ttttttttc ttaaaaacca agacatatgg agaaacattg gacttttagaa tggacattcc 1800
 ctttgttttt catggatgtc agcgatgttc ttccttttga aacataaac tctgagcatt 1860
 attcatttca tggtgcttta taaagtcaat ttgtaaattt gtgctactag tgaaggtggt 1920
 ttaaaacctt tgactatgaa gtataaacgt ttttagctct ttttagtattt agtggacgaa 1980
 aatcttgcatt ttctttgcca ttggcgcaga atggctgttt ttatgacctt cttcaaattc 2040
 taaagttgaa gtgacattta acgaatcgtc tcatgatggt agtgttggat ttaaaatgct 2100
 agctttactg taaaggagat ggttttagttt cttgagctgt aataggaaac ttttttccag 2160
 ccaagtgtgt ttatgtatta gttttgcttt cctgtattct gcttactga tctgtttctca 2220
 gcaatctatt tttatggacg catggaaatt agacatcaca aactatctga tctgccagta 2280
 tttgttgtga aagttcagaa aaaataatta aaatcattct gtagattaa aaaaaaaaaa 2340
 aaaacccgcc cggcgagatc tcct 2364

<210> 5
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> zfDOR1b, secuencia utilizada para la reducción del receptor opioide Delta1b

<400> 5
 ggaggctcca ttatgctcgt ccct 25

<210> 6
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Control MO

<400> 6
 cctcttacct cagttacaat ttata 25



- ②① N.º solicitud: 201330192
 ②② Fecha de presentación de la solicitud: 14.02.2013
 ③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

201

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	PINAL-SEOANE, N. et al., 'Characterization of a new duplicate delta-opioid receptor from zebrafish', JOURNAL OF MOLECULAR ENDOCRINOLOGY, 2006, Vol. 37, No. 3, Páginas 391-403, ISSN: 0952-5041 (print), Resultados, Figura 1 y 7; Discusión.	1-6
Y	todo el documento.	7-19
Y	BUCHNER, R.R. et al., 'Anti-human kappa opioid receptor antibodies: characterization of site-directed neutralizing antibodies specific for a peptide kappa R(33-52) derived from the predicted amino terminal region of the human kappa receptor', JOURNAL OF IMMUNOLOGY, 1997, Vol. 158, No. 4, Páginas 1670-1680, ISSN: 0022-1767 (Print), Materiales y Métodos.	7-19
Y	MANECKJEE, R. et al., 'Characterization of a polyclonal antibody to the mu opioid receptor', JOURNAL OF NEUROIMMUNOLOGY, 1988, Vol. 17, No. 3, Páginas 199-208, ISSN: 0165-5728, Materiales y Métodos.	7-19
A	BIDLACK, J.M. et al., 'A monoclonal antibody capable of modulating opioid binding to rat neural membrane', JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, 1985, Vol. 260, No. 29, Páginas 15655-15661, ISSN: 0021-9258 (print), todo el documento.	1-19

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia
 Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría
 A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita
 P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud
 E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
21.07.2014

Examinador
J. L. Vizán Arroyo

Página
1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C07K14/705 (2006.01)

C12N15/12 (2006.01)

C07K16/28 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C07K, C12N

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, EMBL-EBI

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 21.07.2014

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 7-19	SI
	Reivindicaciones 1-6	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 7-19	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	PINAL-SEOANE, N. ET AL., <i>J. MOL. ENDOCRINOL.</i> , (2006), 37(3): 391-403.	2006
D02	BUCHNER, R.R. ET AL., <i>J. IMMUNOL.</i> , (1997), 158(4): 1670-80.	1997
D03	MANECKJEE, R. ET AL., <i>J. NEUROIMMUNOL.</i> , (1988), 17(3): 199-208.	1988
D04	BIDLACK, J.M. ET AL., <i>J. BIOL. CHEM.</i> , (1985), 260(29): 15655-61.	1985

En D01 se divulga la clonación y caracterización molecular del gen del pez cebra (*Dario rerio*) que codifica para el receptor opioide ZFOR4, o también denominado receptor opioide tipo Delta1b de *Dario rerio* por su homología con el receptor opioide δ de mamíferos.

En D02-D04 se describe la obtención de anticuerpos poli- y monoclonales específicos frente al receptores opioides de mamíferos.

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

1. NOVEDAD (Art. 4.1. y Art. 6.1. de la Ley de Patentes) y ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 4.1. y Art. 8.1. de la Ley de Patentes).

1.1 Reivindicaciones independientes 1, 2, 7, 10 y 17.

1.1.1. El objeto de las reivindicaciones 1 y 2 consiste en el péptido cuya secuencia de aminoácidos es SEQ ID NO:1 y en un polinucleótido que codifica para el péptido SEQ ID NO:1, en particular, el polinucleótido SEQ ID NO:2 (reivindicación 3). La reivindicaciones 7 y 10 consisten en un método de obtención de anticuerpos policlonales frente al receptor opioide tipo Delta1b de *Dario rerio* (receptor ZFOR4) y en el anticuerpo obtenido, específico frente a SEQ ID NO: 1. La reivindicación 17 consiste en un método de detección del receptor ZFOR4 caracterizado básicamente por el uso de los anticuerpos reivindicados previamente.

Según la descripción, la secuencia SEQ ID NO:1 se corresponde con los 30 últimos aminoácidos del extremo C-terminal, residuos del I344 al T373, del receptor opioide tipo Delta1b de *Dario rerio* (SEQ ID NO: 3), y SEQ ID NO:2, con el fragmento comprendido entre los nucleótidos 1122 y 1214 del gen (SEQ ID NO: 4) que codifica para ZFOR4 (cf. Página 6, líneas 16-20; Página 7, líneas 20-23).

En el documento D01 se divulga la secuencia completa de aminoácidos de la proteína ZFOR4 y, además, se analiza su homología, incluyendo la de los 30 últimos aminoácidos del extremo C-terminal, con respecto a las secuencias de receptores opioides δ (DOR) de diferentes orígenes y del receptor ZFOR1 de *Dario rerio* (cf. D01: Resultados y Discusión; Figuras 1 y 7). En particular, se describe la secuencia del extremo C-terminal de ZFOR4 como uno de los dominios de la proteína con un grado de homología menor frente a la secuencia de los receptores opioides mencionados. Además, en D02-D03 se divulgan procedimientos de obtención de anticuerpos poli- y monoclonales frente a receptores opioides de mamíferos y, más en particular, frente a péptidos sintéticos homólogos a la secuencia del receptor opioide K humano (cf. D02-D03: Materiales y métodos).

Por consiguiente, sobre la base del documento D01, se considera que el péptido y el polinucleótido, objeto de las reivindicaciones 1 y 2, así como el de las reivindicaciones dependientes 3-6, no son nuevos, pues sus secuencias han sido previamente descritas y caracterizadas como parte constitutiva de la secuencia del receptor ZFOR4. Además, se considera que las soluciones propuestas en las reivindicaciones 7, 10 y 17, y en 8, 9, 11-16, 18, 19, no son inventivas, pues se estima que, ante el problema técnico planteado en dichas reivindicaciones, el experto en la materia combinaría las enseñanzas divulgadas en D01 con las de D02-D03 llegando a la solución propuesta o a una equivalente.

1.2. La presente solicitud no satisface el criterio establecido en el Art. 4.1. de la Ley de Patentes, pues el objeto de las reivindicaciones 1-6 no es nuevo y el de las reivindicaciones 7-19 carece de actividad inventiva de acuerdo con los Arts. 6.1. y 8.1. de la Ley de Patentes.