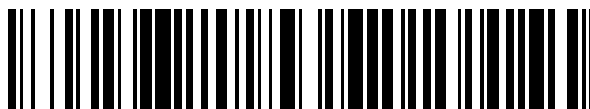


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 682 679**

51 Int. Cl.:

A61P 25/00 (2006.01)

A61K 38/48 (2006.01)

A61K 39/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.07.2014** **PCT/GB2014/052101**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.01.2015** **WO15004464**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.07.2014** **E 14739923 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.05.2018** **EP 3019241**

54 Título: **Supresión del picor**

30 Prioridad:

09.07.2013 GB 201312295

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

21.09.2018

73 Titular/es:

IPSEN BIOINNOVATION LIMITED (100.0%)
Units 4-10 The Quadrant, Barton Lane
Abingdon Oxfordshire OX14 3YS, GB

72 Inventor/es:

FOSTER, KEITH

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 682 679 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

Supresión del picor

5 La presente invención proporciona métodos y composiciones para la supresión o el tratamiento del picor.

El picor, conocido médicamente como prurito, se ha definido como una "sensación desagradable en la piel que provoca el deseo o el reflejo de rascarse". A los pacientes que padecen picor intenso a menudo les resulta difícil llevar una vida normal debido a la incomodidad y las alteraciones psicológicas asociadas, tal como depresión o falta de sueño. El picor también puede ser una condición debilitante que acompaña a numerosos trastornos de la piel, sistémicos y del sistema nervioso.

Se plantea la hipótesis de que el picor ha evolucionado para proteger a los animales contra las pequeñas amenazas por agentes dañinos que se enredan en la superficie del cuerpo, como los insectos y las espinas de las plantas, que no serían eliminados de manera efectiva por la respuesta de abstinencia, asociada con la detección del dolor. Una estrecha relación evolutiva es evidente en la superposición entre el picor y las neuronas del dolor: ambas están mediadas por terminaciones nerviosas libres de fibras nerviosas de tipo C amielínicas (nociceptores). Existe una infinidad de mediadores capaces de estimular estos nervios, tales como aminas biógenas, alcaloides, proteasas y péptidos. Los nociceptores detectan los mediadores a través de sus axones periféricos y envían señales a la médula espinal para producir, por ejemplo, sensaciones del picor en el cerebro. Para los médicos, la superposición entre picor y dolor significa que las mismas enfermedades neurológicas que pueden causar dolor neuropático también pueden causar picor neuropático. Sin embargo, existen diferencias. La mayoría de los tratamientos efectivos para el dolor no son efectivos para el picor. Notablemente, algunos analgésicos tales como remedios para el dolor opioides (p. ej., morfina) incluso causan, o empeoran el picor.

Estudios recientes han comenzado a delinear las características del circuito del picor separado del dolor. Se ha sugerido que el picor se caracteriza por ser transmitido por un subconjunto de nociceptores, denominados "pruriceptores" o fibras nerviosas específicas del picor, localizadas en la unión dermoepidérmica y dentro de la epidermis. Se cree que ciertos receptores acoplados a proteína G (RAPG) expresados específicamente en las neuronas sensitivas en los ganglios de la raíz dorsal (GRD) o en el nervio trigémino desempeñan un papel esencial en las sensaciones únicas del picor. Este grupo de receptores se ha identificado recientemente como único para el picor (es decir, no están implicados en el circuito del dolor), y presentan dianas terapéuticas potenciales para suprimir el picor.

Según el estudio Global Burden of Disease (GBD) realizado en 2000, el 4% de la población (aproximadamente 280 millones) sufre condiciones asociadas con el picor. Actualmente, los medicamentos antihistamínicos y corticosteroides pueden aliviar algunos tipos de picor agudo y un pequeño porcentaje de tipos de picor crónico. Sin embargo, no tratan la mayoría de los casos de picor crónico provocado por enfermedades renales y hepáticas, cánceres además de enfermedades de la piel como dermatitis atópica. Además, los antihistamínicos solo contrarrestan el picor dependiente de histamina (generalmente desencadenada por un estímulo alérgico). Sin embargo, el picor independiente de histamina representa la mayoría de los casos de picor.

El rascado severo puede dañar la piel y hacerla propensa a la infección, con serias implicaciones para los pacientes inmunocomprometidos (en los que el picor puede ser secundario a una enfermedad o reacción a un medicamento). Además, la piel lesionada e infectada debido al picor a menudo intensifica el "ciclo picor-rascado-picor" (el ciclo del cual un picor exige un rascado y el rascado profundiza aún más un picor). Otras técnicas para aliviar el picor recomendadas por los médicos incluyen: fototerapia, llevar ropa suelta de algodón; tomar baños cortos frecuentes en agua tibia y mantener un ambiente fresco con un nivel de humedad de 30% a 40%. Sin embargo, estas medidas preventivas no siempre son posibles de mantener. Por lo tanto, sigue existiendo la necesidad en la técnica de nuevos medicamentos para suprimir o tratar el picor.

Esta necesidad se aborda mediante la presente invención, que resuelve uno o más de los problemas mencionados anteriormente.

Compendio de la invención

La presente invención se refiere a uno o más de los problemas mencionados anteriormente proporcionando una proteína de fusión para uso en la supresión o el tratamiento del picor en un sujeto (p. ej., un paciente), comprendiendo dicha proteína de fusión:

(i) una proteasa no citotóxica, que puede escindir una proteína SNARE, por sus siglas en inglés (receptor soluble de proteína de unión a factor sensible a N-etilmaleimida) en una neurona del GRD específica del picor o un pruriceptor;

(ii) un conector selectivo (TM, por sus siglas en inglés) que es capaz de unirse a un sitio de unión en una neurona del GRD específica del picor o un pruriceptor, cuyo sitio de unión es capaz de experimentar

endocitosis para ser incorporado en un endosoma dentro de la neurona del GRD específica o un pruriceptor, y en donde dicha neurona del GRD específica del picor o un pruriceptor expresa dicha proteína SNARE; y

- 5 (iii) un dominio de translocación que es capaz de translocar la proteasa desde dentro de un endosoma, a través de la membrana endosomal y hacia el citosol de la neurona del GRD específica del picor o un pruriceptor;

con la condición de que el polipéptido no sea una molécula de neurotoxina clostridial (holotoxina).

Como se reivindica, el sitio de unión es un receptor acoplado a proteína G relacionado con Mas (Mrgpr).

También se describe un método correspondiente para suprimir o tratar el picor, comprendiendo dicho método administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un polipéptido de la presente invención a un paciente.

- 10 La invención también proporciona un polipéptido que comprende:

(i) una proteasa no citotóxica, que es capaz de escindir una proteína SNARE en una neurona del GRD específica del picor o un pruriceptor;

- 15 (ii) un conector selectivo (TM) que es capaz de unirse a un receptor acoplado a proteína G relacionado con Mas (Mrgpr) en la neurona del GRD específica del picor o un pruriceptor, cuyo Mrgpr es capaz de experimentar endocitosis para ser incorporado a un endosoma dentro de una neurona del GRD específica del picor o un pruriceptor, y en donde dicha neurona del GRD específica del picor o un pruriceptor expresa dicha proteína SNARE; y

(iii) un dominio de translocación que es capaz de translocar la proteasa desde dentro de un endosoma, a través de la membrana endosomal y hacia el citosol de la neurona del GRD específica del prurito o un pruriceptor;

- 20 con la condición de que el polipéptido no sea una molécula de neurotoxina clostridial (holotoxina), y en donde el TM se selecciona del grupo que consiste en: un péptido de hormona estimulante de melanocitos (MSH), neuropéptidos que terminan en Y-G o Y- amida, una cloroquina (CQ), un péptido que comprende SLIGRL-NH₂, histamina, serotonina o truncaciones o análogos peptídicos de los mismos.

Descripción detallada de la invención

- 25 El polipéptido de la presente invención no es una molécula de neurotoxina clostridial de origen natural (también conocida como holotoxina clostridial). La holotoxina clostridial es una de las neurotoxinas más letales conocidas por el hombre y, como tal, tiene limitaciones significativas como molécula terapéutica. Además, en el contexto de supresión de picor, la holotoxina clostridial está asociada con una actuación indeseable fuera de sitio, es decir, actuación en células distintas de las células nerviosas de la vía del picor.

- 30 En uso, un polipéptido de la invención se une a un receptor en una neurona del GRD específica del picor o un pruriceptor. El componente de translocación efectúa el transporte del componente proteasa hacia citosol de la neurona del GRD específica del picor o un pruriceptor. Finalmente, una vez dentro, la proteasa inhibe el proceso de fusión exocítica de la neurona del GRD específica del picor o un pruriceptor escindiendo la proteína SNARE presente en el citosol de la neurona del GRD específica del picor o un pruriceptor. Por lo tanto, inactivando el aparato de fusión exocítica de la neurona del GRD específica del picor o un pruriceptor, el polipéptido de la invención inhibe la secreción de neurotransmisor a partir del mismo. Por consiguiente, el polipéptido de la invención reduce el nivel del neurotransmisor enviado a la médula espinal desde la neurona del GRD específica del picor o un pruriceptor y, por lo tanto, es capaz de suprimir o tratar el picor. En una realización, el neurotransmisor es acetilcolina. En una realización preferida, el neurotransmisor es glutamato. En otra realización preferida, el neurotransmisor es proteína liberadora de gastrina (GRP, por sus siglas en inglés).

- Los polipéptidos de la presente invención proporcionan una clara ventaja sobre otros agentes terapéuticos ya que tienen el potencial de inhibir la secreción de una célula diana específica, la neurona del GRD específica del picor o un pruriceptor. Por el contrario, otros agentes terapéuticos propuestos buscan reducir el picor intentando utilizar un antagonista del receptor que media el efecto. Sin embargo, la presente invención proporciona un medio para bloquear específicamente la secreción de neurotransmisores desde su sitio de producción.

- La célula diana principal de la presente invención es una neurona del GRD específica del picor o un pruriceptor. Las células GRD están ubicadas a lo largo de la columna vertebral por la columna, y son un sitio de expresión de RAPG tales como MrgprX1, MrgprA3 o MrgprC11, que se han identificado como receptores específicos del picor.

- 50 Las proteínas de fusión de la presente invención generalmente demuestran una afinidad de unión reducida (en la región de hasta 10 a 100 veces) para las células diana cuando se comparan con el TM 'libre' correspondiente (es decir, el TM aislado *per se*). Sin embargo, a pesar de esta observación, las proteínas de fusión de la presente invención demuestran sorprendentemente una buena eficacia. Esto se puede atribuir a dos características principales. En primer lugar, el componente proteasa no citotóxica es catalítico, por lo tanto, el efecto terapéutico de algunas de tales moléculas se amplifica rápidamente dentro de una célula diana. En segundo lugar, los receptores presentes en las células diana solo necesitan actuar como una puerta de entrada para la entrada del agente

terapéutico, y no necesitan ser estimulados necesariamente a un nivel requerido para lograr una respuesta farmacológica mediada por la unión ligando-receptor. Por consiguiente, las proteínas de fusión de la presente invención se pueden administrar a una dosis que es inferior a la que se emplearía para otros tipos de moléculas terapéuticas, que se administran típicamente a cantidades altas de microgramos a miligramos (incluso hasta cientos de miligramos). En contraste, las proteínas de fusión de la presente invención se pueden administrar a dosis mucho más bajas, típicamente al menos 10 veces más bajas, y más típicamente a 100 veces más bajas.

La proteasa no citotóxica

El componente biológicamente activo de los polipéptidos TSI de la presente invención es una proteasa no citotóxica. Por lo tanto, una vez enviado hasta el citosol de una célula diana, el componente proteasa no citotóxica produce la escisión de SNARE dentro de la célula diana deseada. Dado que las proteínas SNARE son un componente esencial del proceso de secreción dentro de las células de mamífero, la inactivación proteolítica de las mismas inhibe/suprime la secreción de dichas células.

Las proteasas no citotóxicas son una clase discreta de moléculas que no matan las células; en cambio, actúan inhibiendo procesos celulares distintos de la síntesis de proteínas. Las proteasas no citotóxicas son producidas por una variedad de organismos superiores (p. ej., plantas y animales); un ejemplo de dicho organismo superior es el escorpión brasileño. Además, las proteasas no citotóxicas son producidas por una variedad de microorganismos, especialmente bacterias tales como *Clostridium* sp. y *Neisseria* sp.

Las neurotoxinas clostridiales representan un grupo principal de moléculas de toxina no citotóxicas, y comprenden dos cadenas polipeptídicas unidas por un enlace disulfuro. Las dos cadenas se denominan cadena pesada (cadena H), que tiene una masa molecular de aproximadamente 100 kDa, y la cadena ligera (cadena L), que tiene una masa molecular de aproximadamente 50 kDa. La cadena L es la que posee una función proteasa y exhibe alta especificidad de sustrato para proteínas SNARE asociadas a vesículas o a la membrana plasmática implicadas en el proceso exocítico (p. ej., sintaxina, SNAP y sinaptobrevina (o VAMP)). Estos sustratos son componentes esenciales de la maquinaria secretora de una célula.

Neisseria sp., especialmente de la especie *N. gonorrhoeae*, produce moléculas de toxina no citotóxicas funcionalmente similares. Un ejemplo de dicha proteasa no citotóxica es la proteasa IgA (véase el documento WO99/58571). Proteasas IgA similares son producidas por estreptococos, como *Streptococcus pneumoniae*.

Por lo tanto, en una realización, la proteasa no citotóxica de la presente invención puede ser una proteasa de neurotoxina clostridial o una proteasa IgA (véase, por ejemplo, el documento WO 99/032272). Otro ejemplo de proteasas no citotóxicas es una proteasa de veneno de escorpión, tales como las del veneno del escorpión brasileño *Tityus serrulatus*, o la proteasa antareasa (véase, por ejemplo, el documento WO 2011/022357).

El conector selectivo (TM, por sus siglas en inglés)

Pasando ahora al componente conector selectivo (TM) de la presente invención, es este componente el que se une al polipéptido de la presente invención con una neurona del GRD específica del picor o un pruriceptor. El TM es preferiblemente un péptido.

En uso, un polipéptido de la invención se une a una neurona del GRD específica del picor o un pruriceptor. A continuación, el componente de translocación del polipéptido efectúa el transporte del componente proteasa hacia el citosol de la neurona del GRD específica del picor o un pruriceptor. Finalmente, una vez dentro, la proteasa inhibe el proceso de fusión exocítica de la neurona del GRD específica del picor o un pruriceptor escindiendo la proteína SNARE presente en el citosol de la neurona del GRD específica del picor o un pruriceptor. Por lo tanto, inactivando el aparato de fusión exocítico de la neurona del GRD específica del picor o un pruriceptor, el polipéptido de la invención inhibe la secreción del neurotransmisor de la misma. Por consiguiente, el polipéptido de la invención reduce la transmisión de señales de sensación de picor a través de la médula espinal al cerebro y, por lo tanto, es capaz de suprimir o tratar el picor.

El TM se une a un sitio de unión en la neurona del GRD específica del picor o un pruriceptor, proporcionando de ese modo selectividad del polipéptido a esta especie de célula diana sobre otras células. A este respecto, las realizaciones de TM preferidas de la presente invención incluyen anticuerpos (p. ej., anticuerpos monoclonales, fragmentos de anticuerpos tales como Fab, F(ab)₂, Fv, ScFv, etc., y péptidos de dominios de anticuerpos), así como andamios para la unión, que se unen a los receptores identificados a continuación. Por consiguiente, los polipéptidos de la presente invención pueden incluir anticuerpos comercialmente disponibles o andamios para la unión, que se han diseñado para conseguir la unión específica a la célula diana o receptor en cuestión.

Alternativamente, los TM preferidos incluyen aminos biógenas, alcaloides, proteasas, ligandos peptídicos y neuropéptidos.

Un TM de la presente invención se une a una neurona del GRD específica del picor o un pruriceptor. Como se reivindica, un TM del polipéptido de la presente invención se une a un receptor acoplado a proteína G (RAPG) en

una neurona del GRD específica del picor o un pruriceptor, seleccionado del grupo que comprende un receptor de proteína G relacionado con Mas (p. ej. MrgprX1, MrgprA3 o MrgprC11).

5 En una realización, el TM se selecciona de un péptido de médula suprarrenal bovina (p. ej., BAM₈₋₂₂), un péptido de hormona estimulante de melanocitos (p. ej., γ 2-MSH), un neuropéptido que termina en un RF/Y-G o un RF/ γ -amida (p. ej. NPFF o NPAF), un péptido que comprende SLIGRL-NH₂, alcaloides (p. ej., cloroquina), aminas biógenas (capsaicina, histamina, serotonina, cortistatina), así como truncamientos y análogos peptídicos de los mismos.

10 En una realización, el TM del polipéptido de la presente invención se une a un receptor en una neurona del GRD específica del picor o un pruriceptor seleccionado del grupo que comprende: MrgprX1, MrgprA3 o MrgprC11. Todos estos receptores se expresan en neuronas GRD específicas del picor o en pruriceptores.

En una realización, el TM se selecciona de: BAM₈₋₂₂, γ 2-MSH, NPFF, NPAF, SLIGRL-NH₂, cloroquina, capsaicina, histamina, serotonina, cortistatina, así como truncamientos y análogos peptídicos de los mismos.

15 Como se reivindica, un TM del polipéptido de la presente invención se une a un receptor Mrgpr, y preferiblemente MrgprX, MrgprA o MrgprC. En una realización, el polipéptido de la presente invención se une a MrgprX1 o MrgprA3 o MrgprC11. A modo de ejemplo, los TM adecuados incluyen: BAM₈₋₂₂, cloroquina, γ 2-MSH, neuropéptidos que terminan en RF/Y-G o una RF/ γ -amida (p. ej., NPFF o NPAF), capsaicina, histamina, serotonina o cortistatina. Estos TM son preferidos para unirse a Mrgprs.

En una realización preferida, el TM se une al receptor MrgprX, preferiblemente MrgprX1; también se prefiere que el TM sea BAM₈₋₂₂ o un truncamiento o análogo peptídico del mismo.

20 El dominio de translocación

El componente de translocación de la presente invención permite la translocación de la proteasa no citotóxica (o fragmento de la misma) a la célula diana para que la expresión funcional de la actividad proteasa se produzca dentro del citosol de la célula diana. El componente de translocación es preferiblemente capaz de formar poros permeables a iones en membranas lipídicas (p. ej., membranas endosomales) en condiciones de pH bajo. El componente de translocación se puede obtener a partir de una fuente de proteica microbiana, por ejemplo, una fuente proteica bacteriana o viral. Por lo tanto, en una realización, el componente de translocación comprende o consiste en un dominio de translocación de una enzima, tal como una toxina bacteriana. En otra realización, el dominio de translocación comprende o consiste en el dominio de translocación de una proteína viral. En una realización, el componente de translocación de la presente invención puede comprender o consistir en una cadena H de neurotoxina clostridial o un fragmento de la misma tal como el dominio H_N (o un fragmento de translocación del mismo) de una neurotoxina clostridial.

Preparación de polipéptidos

35 Los polipéptidos de la presente invención comprenden 3 componentes principales: un "bioactivo" (es decir, una proteasa no citotóxica); un TM; y un dominio de translocación. La tecnología general asociada con la preparación de tales proteínas de fusión a menudo se denomina tecnología de toxinas redirigidas. A modo de ejemplo, nos referimos a los documentos: WO94/21300; WO96/33273; WO98/07864; WO00/10598; WO01/21213; WO06/059093; WO00/62814; WO00/04926; WO93/15766; WO00/61192; y WO99/58571.

40 Con más detalle, el componente TM de la presente invención se puede fusionar al componente proteasa o al componente de translocación de la presente invención. Dicha fusión es preferiblemente por medio de un enlace covalente, por ejemplo, un enlace covalente directo o a través de una molécula espaciadora/conectora. El componente proteasa y el componente de translocación se unen preferiblemente entre sí mediante un enlace covalente, por ejemplo, un enlace covalente directo o a través de una molécula espaciadora/conectora. Las moléculas espaciadoras/conectoras adecuadas son bien conocidas en la técnica, y típicamente comprenden una secuencia basada en aminoácidos de longitud entre 5 y 40, preferiblemente entre 10 y 30 restos de aminoácidos.

45 En uso, los polipéptidos tienen una conformación de doble cadena, en donde el componente proteasa y el componente de translocación están unidos entre sí, preferiblemente a través de un enlace disulfuro.

50 Los polipéptidos de la presente invención se pueden preparar mediante técnicas de conjugación química convencionales, que son bien conocidas por una persona experta. A modo de ejemplo, se hace referencia a Hermanson, G.T. (1996), Bioconjugate techniques, Academic Press, y a Wong, S.S. (1991), Chemistry of protein conjugation and cross-linking, CRC Press, Nagy et al., PNAS 95 p1794-99 (1998). Se proporcionan metodologías detalladas adicionales para unir los TM sintéticos a un polipéptido de la presente invención en, por ejemplo, EP0257742.

55 Alternativamente, los polipéptidos se pueden preparar mediante preparación recombinante de una proteína de fusión polipeptídica individual (véase, por ejemplo, el documento WO98/07864). Esta técnica se basa en el mecanismo bacteriano *in vivo* mediante el cual se prepara neurotoxina clostridial nativa (es decir, holotoxina), y da como resultado una proteína de fusión que tiene la siguiente disposición estructural 'simplificada':

NH₂ - [componente proteasa] - [componente de translocación] - [TM] - COOH

Según el documento WO98/07864, el TM se coloca hacia el extremo C-terminal de la proteína de fusión. La proteína de fusión se activa entonces por tratamiento con una proteasa, que se escinde en un sitio entre el componente proteasa y el componente de translocación. Por lo tanto, se produce una proteína de doble cadena que comprende el componente proteasa como una cadena polipeptídica individual unida covalentemente (a través de un puente disulfuro) a otra cadena polipeptídica individual que contiene el componente de translocación más TM.

Alternativamente, según el documento WO06/059093, el componente TM de la proteína de fusión está localizado hacia el centro de la secuencia de la proteína de fusión lineal, entre el sitio de escisión de proteasa y el componente de translocación. Esto asegura que el TM está unido al dominio de translocación (es decir, como ocurre con la holotoxina clostridial nativa), aunque en este caso los dos componentes están invertidos en orden con respecto a la holotoxina nativa. La posterior escisión en el sitio de escisión de proteasa expone la porción N-terminal del TM, y proporciona la proteína de fusión polipeptídica de doble cadena.

Otra alternativa es la presentación del 'ligando dividido' del componente TM de la proteína de fusión. Aquí el componente TM, que actúa como un ligando, tiene tanto un dominio N-terminal libre como un dominio C-terminal libre. Por lo tanto, el TM es capaz de interactuar con el sitio de unión (p. ej., un receptor o aceptor) en una célula diana a través de una interacción entre una porción N-terminal del conector selectivo y un dominio del sitio de unión. Alternativamente, el TM es capaz de una interacción entre la porción C-terminal del conector selectivo y un dominio de un sitio de unión. O bien, el TM es capaz de una interacción doble, en donde una porción N-terminal del conector selectivo interactúa con un dominio del sitio de unión y una porción C-terminal del conector selectivo interactúa con un dominio de un sitio de unión. En esta última realización, las porciones N- y C-terminales del TM se pueden unir a los mismos o diferentes dominios de un sitio de unión, y/o se pueden unir a dominios en diferentes sitios de unión. Se puede encontrar información adicional con respecto a esta disposición en el documento WO2012156743.

La o las secuencias de escisión de proteasas mencionadas anteriormente se pueden introducir (y/o cualquier secuencia de escisión inherente eliminada) a nivel de ADN por medios convencionales, tales como mediante mutagénesis dirigida al sitio. El cribado para confirmar la presencia de secuencias de escisión se puede realizar manualmente o con la ayuda de un programa informático (p. ej., el programa MapDraw de DNASTAR, Inc.). Aunque se puede emplear cualquier sitio de escisión de proteasa (es decir, clostridial o no clostridial), se prefieren los siguientes:

Enteroquinasa	(DDDDK↓) (SEQ ID NO: 1)
Factor Xa	(IEGR↓ / IDGR↓) (SEQ ID NOS 2 Y 3)
TEV (Virus del grabado del tabaco)	(ENLYFQ↓G) (SEQ ID NO: 4)
Trombina	(LVPR↓GS) (SEQ ID NO: 5)
Pre-escisión	(LEVLFQ↓GP). (SEQ ID NO: 6)

Los sitios de escisión de proteasa adicionales incluyen secuencias de reconocimiento que se escinden mediante una proteasa no citotóxica, por ejemplo mediante una neurotoxina clostridial. Estas incluyen las secuencias de reconocimiento de proteína SNARE (p. ej., SNAP-25, syntaxina, VAMP) que se escinden mediante proteasas no citotóxicas tales como neurotoxinas clostridiales. Se proporcionan ejemplos particulares en US2007/0166332.

El término sitio de escisión de proteasa también abarca una inteína, que es una secuencia de autoescisión. La reacción de autoempalme es controlable, por ejemplo variando la concentración de agente reductor presente. Los sitios de escisión de 'activación' mencionados anteriormente también se pueden emplear como un sitio de escisión 'destrutivo' (discutido a continuación) si se incorpora uno en un polipéptido de la presente invención.

En una realización preferida, la proteína de fusión de la presente invención puede comprender una o más etiquetas de purificación localizadas en N-terminal y/o C-terminal. Aunque se puede emplear cualquier etiqueta de purificación, se prefieren los siguientes:

Etiqueta His (p. ejemplo, 6 x histidina) (SEQ ID NO: 7), preferiblemente como una etiqueta C-terminal y/o N-terminal

Etiqueta MBP (proteína de unión a maltosa), preferiblemente como una etiqueta N-terminal

Etiqueta GST (glutación-S-transferasa), preferiblemente como una etiqueta N-terminal

Etiqueta His-MBP, preferiblemente como una etiqueta N-terminal

Etiqueta GST-MBP, preferiblemente como una etiqueta N-terminal

Etiqueta Tiorredoxina, preferiblemente como una etiqueta N-terminal

Etiqueta CBD (dominio de unión a quitina), preferiblemente como una etiqueta N-terminal.

5 Se pueden incluir una o más moléculas espaciadoras/conectoras peptídicas en la proteína de fusión. Por ejemplo, se puede emplear un espaciador peptídico entre una etiqueta de purificación y el resto de la molécula de proteína de fusión.

La presente invención también proporciona una secuencia de ADN que codifica una proteína de fusión de la invención reivindicada.

10 La secuencia de ADN se puede preparar como parte de un vector de ADN, en donde el vector comprende un promotor y un terminador.

En una realización preferida, el vector tiene un promotor seleccionado de:

Promotor	Agente de inducción	Condición de inducción típica
Tac (híbrido)	IPTG	0,2 mM (0,05-2,0mM)
AraBAD	L-arabinosa	0,2% (0,002-0,4%)
Operador T7-lac	IPTG	0,2 mM (0,05-2,0mM)

La construcción de ADN de la presente invención se diseña preferiblemente *in silico*, y luego se sintetiza mediante técnicas de síntesis de ADN convencionales.

15 La información de la secuencia de ADN mencionada anteriormente se modifica opcionalmente por sesgo de codones según el sistema de expresión de la célula anfitriona final (p. ej., *E. coli*) que se va a emplear.

La cadena principal de ADN se selecciona preferiblemente para cualquier secuencia de ácido nucleico inherente, que cuando se transcribe y traduce produciría una secuencia de aminoácidos correspondiente al sitio de escisión de proteasa codificado por la segunda secuencia de codificación de péptido. El cribado se puede realizar manualmente o con la ayuda de un programa informático (p. ej., el programa MapDraw de DNASTAR, Inc.).

20 La referencia a "suprimir" y "tratar" como se utiliza en la presente memoria, significa proporcionar un beneficio terapéutico a un sujeto. Incluye, por ejemplo, administrar una proteína de fusión como se define en la presente memoria para prevenir o disminuir la gravedad del picor.

25 Un aspecto adicional de la invención como se describe es un método para prevenir o suprimir el picor, en donde dicho método comprende administrar a dicho sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de una proteína de fusión que comprende:

(i) una proteasa no citotóxica, que es capaz de escindir una proteína SNARE en una neurona del GRD específica del picor o un pruriceptor;

30 (ii) un conector selectivo (TM) que es capaz de unirse a un sitio de unión en una neurona del GRD específica del picor o un pruriceptor, cuyo sitio de unión es capaz de experimentar endocitosis para ser incorporado en un endosoma en la neurona del GRD específica del picor o un pruriceptor, y en donde dicha neurona del GRD específica del picor o un pruriceptor expresa dicha proteína SNARE; y

(iii) un dominio de translocación que es capaz de translocar la proteasa desde dentro de un endosoma, a través de la membrana endosomal y hacia el citosol de la neurona del GRD específica del picor o un pruriceptor;

35 con la condición de que el polipéptido no sea una molécula de neurotoxina clostridial (holotoxina).

Las proteínas de fusión de la presente invención pueden incluir un sitio de escisión de proteasa destructivo, que es susceptible de escisión (por una proteasa local) en el caso de que la proteína de fusión pueda migrar a una posición fuera del sitio. Este enfoque ayuda a minimizar el riesgo actuación fuera de sitio. Por lo tanto, las proteínas de fusión de la presente invención se pueden diseñar para incluir uno o más sitios de escisión destructivos, por ejemplo, como se describe en los documentos WO 2010/094905 y WO 2002/44199.

Administración del polipéptido

En uso, la presente invención puede emplear una composición farmacéutica que comprende un polipéptido, junto con al menos un componente seleccionado de un vehículo farmacéuticamente aceptable, excipiente, adyuvante, propelente y/o sal.

Los polipéptidos de la presente invención se pueden formular para aplicación oral, parenteral, infusión continua, implante, inhalación o tópica. Las composiciones adecuadas para inyección pueden estar en forma de soluciones, suspensiones o emulsiones, o polvos secos que se disuelven o suspenden en un vehículo adecuado antes del uso.

- 5 Los medios de administración locales pueden incluir una administración oral o gástrica. A este respecto, se pueden utilizar formulaciones en cápsulas con recubrimiento entérico u otros sistemas particulados tales como microesferas. La administración local al duodeno mediante cirugía laparoscópica también es posible. Otros ejemplos de administración local también pueden incluir administración transdérmica (a través de un parche adhesivo).

La vía de administración preferida se selecciona de: sistémica, oral, laparoscópica y/o inyección localizada.

- 10 En el caso de formulaciones para inyección, es opcional incluir una sustancia farmacéuticamente activa para ayudar a la retención o reducir la eliminación del polipéptido del sitio de administración. Un ejemplo de tal sustancia farmacéuticamente activa es un vasoconstrictor tal como adrenalina. Dicha formulación confiere la ventaja de aumentar el tiempo de residencia del polipéptido después de la administración y así aumentar y/o potenciar su efecto.

- 15 Los intervalos de dosificación para la administración de los polipéptidos de la presente invención son aquellos que producen el efecto terapéutico deseado. Se apreciará que el intervalo de dosificación requerido depende de la naturaleza precisa del polipéptido o composición, la vía de administración, la naturaleza de la formulación, la edad del paciente, la naturaleza, extensión o gravedad de la enfermedad del paciente, contraindicaciones, si hay alguna, y el juicio del médico responsable. Las variaciones en estos niveles de dosificación se pueden ajustar utilizando rutinas empíricas estándar para la optimización.

- 20 Las dosificaciones diarias adecuadas (por kg de peso del paciente) están en el intervalo 0,0001-1 mg/kg, preferiblemente 0,0001-0,5 mg/kg, más preferiblemente 0,002-0,5 mg/kg, y particularmente preferiblemente 0,004-0,5 mg/kg. La dosificación unitaria puede variar de menos de 1 microgramo a 30 mg, pero típicamente estará en la región de 0,01 a 1 mg por dosis, que se puede administrar diariamente o preferiblemente con menos frecuencia, tal como semanal o semestral.

- 25 Un régimen de dosificación particularmente preferido se basa en 2,5 ng de polipéptido como la dosis 1X. A este respecto, las dosificaciones preferidas están en el intervalo 1X-100X (es decir, 2,5-250 ng).

- 30 Las formas farmacéuticas líquidas se preparan típicamente utilizando el polipéptido y un vehículo estéril exento de pirógenos. El polipéptido, dependiendo del vehículo y la concentración utilizada, se puede disolver o suspender en el vehículo. En la preparación de soluciones, el polipéptido se puede disolver en el vehículo, siendo la solución hecha isotónica si es necesario mediante adición de cloruro de sodio y esterilizada mediante filtración a través de un filtro estéril utilizando técnicas asépticas antes de llenar viales o ampollas estériles adecuadas y de sellarlas. Alternativamente, si la estabilidad de la solución es adecuada, se puede esterilizar la solución en sus recipientes sellados mediante autoclave. Ventajosamente, los aditivos tales como agentes de tamponamiento, solubilización, estabilización, conservantes o bactericidas, agentes suspensores o emulsionantes y/o anestésicos locales se pueden disolver en el vehículo.

- 35 Los polvos secos, que se disuelven o suspenden en un vehículo adecuado antes de su uso, se pueden preparar llenando un recipiente estéril con los ingredientes preesterilizados utilizando una técnica aséptica en un área estéril. Alternativamente, los ingredientes se pueden disolver en recipientes adecuados utilizando una técnica aséptica en un área estéril. El producto entonces se liofiliza y los envases se sellan de forma aséptica.

- 40 Las suspensiones parenterales, adecuadas para inyección intramuscular, subcutánea o intradérmica, se preparan sustancialmente de la misma manera, excepto que los componentes estériles se suspenden en el vehículo estéril, en lugar de estar disueltos ya que la esterilización no se puede realizar mediante filtración. Los componentes se pueden aislar en un estado estéril o alternativamente se pueden esterilizar después del aislamiento, p. ej., mediante irradiación gamma.

- 45 Ventajosamente, se incluye un agente de suspensión, por ejemplo polivinilpirrolidona en la composición o composiciones para facilitar la distribución uniforme de los componentes.

- La administración de acuerdo con la presente invención puede aprovechar una variedad de tecnologías de administración que incluyen encapsulación de micropartículas, sistemas de administración viral o impacto de aerosol a alta presión.

Sección de definiciones

- 55 Conector selectivo (TM) significa cualquier estructura química que interactúa funcionalmente con un sitio de unión para causar una asociación física entre el polipéptido de la invención y la superficie de una célula diana. En el contexto de la presente invención, la célula diana es una neurona del GRD específica del picor o un pruriceptor. El término TM abarca cualquier molécula (es decir, una molécula de origen natural o una variante químicamente/físicamente modificada de la misma) que es capaz de unirse a un sitio de unión en la célula diana,

cuyo sitio de unión puede experimentar interiorización (p. ej., formación de endosomas) - también denominada endocitosis mediada por receptor. El TM puede poseer una función de translocación de membrana endosomal, en cuyo caso los componentes separados de TM y dominio de translocación no necesitan estar presentes en un agente de la presente invención. A lo largo de la descripción anterior, se han descrito TM específicos. La referencia a dichos TM en el contexto de los usos médicos reivindicados es meramente a modo de ejemplo, y la presente invención abarca todas las variantes y derivados de los mismos, que retienen la capacidad de unión básica (es decir, actuación) de los TM ejemplificados.

Un TM según la presente invención incluye anticuerpos (p. ej., fragmentos de anticuerpos) y andamios para la unión; especialmente anticuerpos/fragmentos y andamios disponibles en el mercado diseñados con el propósito de unirse (p. ej., específicamente) a células diana.

Los andamios proteicos representan una nueva generación de estructuras de unión universales para complementar el repertorio en expansión de anticuerpos monoclonales terapéuticos y derivados tales como scFvs, moléculas Fab, dAbs (anticuerpos de dominio único), camélidos, diacuerpos y minicuerpos, cada uno de los cuales se puede emplear como un TM de la presente invención. Los sistemas de andamios crean o modifican dominios de reconocimiento de proteínas conocidas, ya sea mediante creación de andamios novedosos o la modificación de dominios de unión proteicos conocidos. Tales andamios incluyen, pero no se limitan a:

(i) andamios basados en proteína A - mimetizadores de anticuerpos (Nord, K. et al 1997, "Binding proteins selected from combinatorial libraries of an alpha-helical bacterial receptor domain", Nat Biotechnol 15, 772 - 777);

(ii) andamios basados en lipocalina - anticalinas (Skerra 2008 "Alternative binding proteins: anticalins - harnessing the structural plasticity of the lipocalin ligand pocket to engineer novel binding activities" FEBS J. 275: 2677 - 83);

(iii) andamios basados en fibronectina - adnectina (Dineen et al 2008 "The Adnectin CT-322 is a novel VEGF receptor 2 inhibitor that decreases tumour burden in an orthotopic mouse model of pancreatic cancer". BMC Cancer 8: 352);

(iv) avimeros (Silverman et al 2005 "Multivalent avimer proteins evolved by exon shuffling of a family of human receptor domains". Nat Biotechnol 23: 1556-61);

(v) andamios basados en anquirina - darpinas (Zahnd et al 2006 "Selection and characterization of Her2 binding-designed ankyrin repeat proteins". J Biol Chem. 281: 35167 - 75); y

(vi) andamios de centirina - basados en un pliegue de proteína que tiene una homología estructural significativa con dominios de Ig con bucles que son análogos a CDR. Los dominios de Ig son un módulo común en proteínas humanas y se han aplicado ampliamente como proteínas de andamiaje alternativas.

Los andamios para la unión se pueden utilizar para dirigirse a tipos de células particulares a través de la interacción con proteínas de superficie celular específicas, receptores u otros epítomos de superficie celular tales como grupos de azúcar. Dichos andamios modificados se pueden diseñar sobre proteasas no citotóxicas recombinantes basadas en polipéptidos de la presente invención.

El TM de la presente invención se une (preferiblemente se une específicamente) a la neurona del GRD específica del picor o a una célula diana pruriceptor en cuestión. Como se reivindica, el TM se une a un Mrgpr en dicha neurona del GRD o célula diana pruriceptor. La expresión "se une específicamente" preferiblemente significa que un TM dado se une a la célula diana con una afinidad de unión (K_a) de 10^6 M^{-1} o mayor, preferiblemente 10^7 M^{-1} o mayor, más preferiblemente 10^8 M^{-1} o mayor, y lo más preferiblemente, 10^9 M^{-1} o mayor. El término "se une específicamente" también puede significar que un TM dado se une a un receptor dado, receptor acoplado a proteína G relacionado con Mas (p. ej., MrgprX1 o MrgprA₁₋₃ o MrgprC11) con una afinidad de unión (K_a) de 10^6 M^{-1} o mayor, preferiblemente 10^7 M^{-1} o mayor, más preferiblemente 10^8 M^{-1} o mayor, y lo más preferiblemente, 10^9 M^{-1} o mayor.

La referencia a TM en la presente memoria abarca fragmentos y variantes de los mismos, que retienen la capacidad de unirse a la célula diana en cuestión. A modo de ejemplo, una variante puede tener al menos 80%, preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 95%, y lo más preferiblemente al menos 97 o al menos 99% de homología de secuencia de aminoácidos con el TM de referencia (p. ej., cualquier SEQ ID NO presentada en la presente memoria, que define un TM). Por lo tanto, una variante puede incluir uno o más análogos de un aminoácido (p. ej., un aminoácido no natural) o un enlace sustituido. Además, a modo de ejemplo, el término fragmento, cuando se utiliza en relación con un TM, significa un péptido que tiene al menos diez, preferiblemente al menos veinte, más preferiblemente al menos treinta, y lo más preferiblemente al menos cuarenta restos de aminoácidos del TM de referencia. El término fragmento también se refiere a las variantes mencionadas anteriormente. Por lo tanto, a modo de ejemplo, un fragmento de la presente invención puede comprender una secuencia peptídica que tiene al menos 10, 20, 30 o 40 aminoácidos, en donde la secuencia peptídica tiene al menos 80% de homología de secuencia sobre una secuencia peptídica correspondiente (de aminoácidos contiguos) del péptido de referencia.

Es habitual confirmar que un TM se une a la célula diana seleccionada o Mrgpr. Por ejemplo, se puede emplear un experimento de desplazamiento radiactivo simple en el que el tejido o las células representativas de una célula diana en cuestión son expuestas a TM marcado (p. ej., trititado) en presencia de un exceso de TM no marcado. En tal experimento, las proporciones relativas de unión no específica y específica se pueden evaluar, permitiendo de ese modo la confirmación de que el TM se une a la célula diana. Opcionalmente, el ensayo puede incluir uno o más antagonistas de unión, y el ensayo puede comprender además la observación de una pérdida de unión de TM. Ejemplos de este tipo de experimento se pueden encontrar en Hulme, E.C. (1990), *Receptor-binding studies, a brief outline*, pp. 303-311, In *Receptor biochemistry, A Practical Approach*, Ed. E.C. Hulme, Oxford University Press.

En el contexto de la presente invención, la referencia a un péptido TM abarca análogos peptídicos de la misma, siempre que el análogo se una al mismo receptor que el TM de referencia correspondiente.

Las proteínas de fusión (también denominadas en la presente memoria polipéptidos) de la presente invención pueden carecer de un dominio H_C o H_{CC} funcional de una neurotoxina clostridial. En una realización, los polipéptidos carecen de los últimos 50 aminoácidos C-terminales de una holotoxina, neurotoxina clostridial. En otra realización, los polipéptidos carecen de los últimos 100, 150, 200, 250 o 300 restos de aminoácidos C-terminales de una holotoxina, neurotoxina clostridial. Alternativamente, la actividad de unión a H_C se puede anular/reducir mediante mutagénesis, a modo de ejemplo, refiriéndose a BoNT/A por conveniencia, modificación de una o dos mutaciones de restos de aminoácidos (W1266 a L e Y1267 a F) en el sitio de unión a gangliósido hace que la región H_C pierda su función de unión al receptor. Se pueden realizar mutaciones análogas en componentes peptídicos clostridiales que no sean de serotipo A, p. ej. una construcción basada en toxina botulínica B con mutaciones (W1262 a L e Y1263 a F) o toxina botulínica E (W1224 a L e Y1225 a F). Otras mutaciones en el sitio activo logran la misma ablación de la actividad de unión al receptor H_C, p. ej. Y1267S en la toxina botulínica tipo A y el resto altamente conservado correspondiente en las otras neurotoxinas clostridiales. Los detalles de esta y otras mutaciones se describen en Rummel et al (2004) (*Molecular Microbiol.* 51:631-634).

El péptido H_C de una neurotoxina clostridial nativa comprende aproximadamente 400-440 restos de aminoácidos, y consta de dos dominios funcionalmente distintos de aproximadamente 25 kDa cada uno, es decir, la región N-terminal (comúnmente referida como el péptido o dominio H_{CN}) y la C- región terminal (comúnmente referida como el péptido o dominio H_{CC}). Además, está bien documentado que la región C-terminal (H_{CC}), que constituye 160-200 restos de aminoácidos C-terminales, es responsable de la unión de una neurotoxina clostridial a sus receptores celulares naturales, concretamente a terminaciones nerviosas en la unión neuromuscular. Por lo tanto, la referencia a lo largo de esta memoria a una cadena pesada clostridial que carece de un péptido H_C de cadena pesada funcional (o dominio) tal que la cadena pesada es incapaz de unirse a receptores de superficie celular a los que se une una neurotoxina clostridial nativa significa que la cadena clostridial pesada simplemente carece de un péptido H_{CC} funcional. En otras palabras, la región del péptido H_{CC} se elimina total o parcialmente, o se modifica de otra manera (p. ej., a través de tratamiento químico o proteolítico convencional) para inactivar su capacidad de unión nativa para las terminaciones nerviosas en la unión neuromuscular.

Por lo tanto, en una realización, un péptido H_N clostridial de la presente invención puede carecer de parte de una porción de péptido C-terminal (H_{CC}) de una neurotoxina clostridial y por lo tanto carece de la función de unión a H_C de la neurotoxina clostridial nativa. A modo de ejemplo, en una realización, el péptido H_N clostridial C-terminalmente extendido carece de los 40 restos de aminoácidos C-terminales, o de los 60 restos de aminoácidos C-terminales, o de los 80 restos de aminoácidos C-terminales, o de los 100 aminoácidos C-terminales, o de los 120 restos de aminoácidos C-terminales, o de los 140 restos de aminoácidos C-terminales, o de los 150 restos de aminoácidos C-terminales, o de los 160 restos de aminoácidos C-terminales de una neurotoxina clostridial de cadena pesada. En otra realización, el péptido H_N clostridial de la presente invención puede carecer de la porción peptídica C-terminal completa (H_{CC}) de una neurotoxina clostridial y, por lo tanto, carece de la función de unión de H_C de la neurotoxina clostridial nativa. A modo de ejemplo, en una realización, el péptido H_N clostridial carece de los 165 restos de aminoácidos C-terminales, o de los 170 restos de aminoácidos C-terminales, o de los 175 restos de aminoácidos C-terminales, o de los 180 restos de aminoácidos C-terminales, o de los 185 restos de aminoácidos C-terminales, o de los 190 restos de aminoácidos C-terminales, o de los 195 restos de aminoácidos C-terminales de una cadena pesada de neurotoxina clostridial. A modo de ejemplo adicional, el péptido H_N clostridial de la presente invención carece de una secuencia de referencia de H_{CC} clostridial seleccionada del grupo que consiste en:

Neurotoxina botulínica tipo A – restos de aminoácidos (Y1111-L1296)

Neurotoxina botulínica tipo B – restos de aminoácidos (Y1098-E1291)

Neurotoxina botulínica tipo C – restos de aminoácidos (Y1112-E1291)

Neurotoxina botulínica tipo D – restos de aminoácidos (Y1099-E1276)

Neurotoxina botulínica tipo E – restos de aminoácidos (Y1086-K1252)

Neurotoxina botulínica tipo F – restos de aminoácidos (Y1106-E1274)

Neurotoxina botulínica tipo G – restos de aminoácidos (Y1106-E1297)

Neurotoxina tetánica – restos de aminoácidos (Y1128-D1315).

Las secuencias de referencia identificadas anteriormente se deberían considerar una guía ya que pueden ocurrir ligeras variaciones según los sub-serotipos.

- 5 La proteasa de la presente invención abarca todas las proteasas no citotóxicas que son capaces de escindir una o más proteínas del aparato de fusión exocítica en células eucarióticas.

La proteasa de la presente invención es preferiblemente una proteasa bacteriana (o fragmento de la misma). Más preferiblemente, la proteasa bacteriana se selecciona de los géneros *Clostridium* o *Neisseria/Streptococcus* (p. ej., una cadena L clostridial, o una proteasa IgA de *Neisseria* preferiblemente de *N. gonorrhoeae* o *S. pneumoniae*). Otro

- 10 ejemplo de proteasas no citotóxicas incluye la proteasa de veneno de escorpión, como las del veneno del escorpión brasileño *Tityus serrulatus*, o la proteasa antareasa.

La presente invención también abarca variantes de proteasas no citotóxicas (es decir, variantes de moléculas de proteasa de origen natural), siempre que las proteasas variantes aún demuestren la actividad de proteasa requerida. A modo de ejemplo, una variante puede tener al menos 70%, preferiblemente al menos 80%, más preferiblemente al menos 90%, y lo más preferiblemente al menos 95% o al menos 98% de homología de secuencia de aminoácidos con una secuencia de proteasa de referencia. Por lo tanto, el término variante incluye proteasas no citotóxicas que tienen actividad endopeptidasa potenciada (o disminuida) - se hace mención particular en la presente memoria al aumento Kcat/Km de mutantes de BoNT/A Q161A, E54A y K165L, véase Ahmed, SA (2008) Protein J. DOI 10.1007/s10930-007-9118-8.

- 20 El término fragmento, cuando se utiliza en relación con una proteasa, típicamente significa un péptido que tiene al menos 150, preferiblemente al menos 200, más preferiblemente al menos 250, y lo más preferiblemente al menos 300 restos de aminoácidos de la proteasa de referencia. Como con el componente "fragmento" TM (discutido anteriormente), los "fragmentos" de proteasa de la presente invención abarcan fragmentos de proteasas variantes basadas en una secuencia de referencia.

- 25 La proteasa de la presente invención demuestra preferiblemente una actividad de serina o metaloproteasa (p. ej., actividad de endopeptidasa). La proteasa es preferiblemente específica para una proteína SNARE (p. ej., SNAP-25, sinaptobrevina/VAMP o syntaxina).

Se hace mención particular a los dominios de proteasa de neurotoxinas, por ejemplo, los dominios de proteasa de neurotoxinas bacterianas. Por lo tanto, la presente invención abarca el uso de dominios de neurotoxina, de origen natural, así como versiones preparadas de forma recombinante de dichas neurotoxinas de origen natural.

- 30 Ejemplos de neurotoxinas son producidas por clostridia, y el término neurotoxina clostridial abarca neurotoxinas producidas por *C. tetani* (TeNT), y por *C. botulinum* (BoNT) serotipos A-G, así como las neurotoxinas similares a BoNT estrechamente relacionadas producidas por *C. baratii* y *C. butyricum*. Las abreviaturas mencionadas anteriormente se utilizan a lo largo de la presente memoria. Por ejemplo, la nomenclatura BoNT/A denota la fuente de neurotoxina como BoNT (serotipo A). La nomenclatura correspondiente se aplica a otros serotipos de BoNT.

Las BoNT son las toxinas más potentes conocidas, con valores medios de dosis letal (LD50) para ratones que varían de 0,5 a 5 ng/kg dependiendo del serotipo.

- 40 Las BoNT se adsorben en el tracto gastrointestinal y, después de entrar en la circulación general, se unen a la membrana presináptica de las terminaciones nerviosas colinérgicas y evitan la liberación de su neurotransmisor acetilcolina. BoNT/B, BoNT/D, BoNT/F y BoNT/G escinden la proteína de membrana asociada a sinaptobrevina/vesícula (VAMP); BoNT/C, BoNT/A y BoNT/E escinden la proteína sinaptosomal asociada de 25 kDa (SNAP-25); y BoNT/C escinde la syntaxina.

- 45 Las BoNT comparten una estructura común, siendo proteínas de doble cadena de ~150 kDa, que consisten en una cadena pesada (cadena H) de ~100 kDa unida covalentemente por un enlace disulfuro a una cadena ligera (cadena L) de ~50 kDa. La cadena H consta de dos dominios, cada uno de ~50 kDa. El dominio C-terminal (H_C) es necesario para la unión neuronal de alta afinidad, mientras que se propone que el dominio N-terminal (H_N) participe en la translocación de la membrana. La cadena L es una metaloproteasa dependiente de zinc responsable de la escisión de la proteína SNARE del sustrato.

- 50 El término fragmento de cadena L significa un componente de la cadena L de una neurotoxina, cuyo fragmento demuestra una actividad metaloproteasa y es capaz de escindir proteolíticamente una vesícula y/o una proteína asociada a la membrana plasmática involucrada en la exocitosis celular.

Los ejemplos de secuencias de proteasa (referencia) adecuadas incluyen:

Neurotoxina botulínica tipo A	- restos de aminoácidos (1-448)
Neurotoxina botulínica tipo B	- restos de aminoácidos (1-440)

Neurotoxina botulínica tipo C	- restos de aminoácidos (1-441)
Neurotoxina botulínica tipo D	- restos de aminoácidos (1-445)
Neurotoxina botulínica tipo E	- restos de aminoácidos (1-422)
Neurotoxina botulínica tipo F	- restos de aminoácidos (1-439)
Neurotoxina botulínica tipo G	- restos de aminoácidos (1-441)
Neurotoxina tetánica	- restos de aminoácidos (1-457)
Proteasa IgA	- restos de aminoácidos (1-959)*

*Pohlner, J. et al. (1987). Nature 325, pp. 458-462.

La secuencia de referencia identificada anteriormente se debería considerar una guía ya que pueden ocurrir ligeras variaciones según los subserotipos. A modo de ejemplo, el documento US 2007/0166332 cita secuencias clostridiales ligeramente diferentes:

5

Neurotoxina botulínica tipo A	- restos de aminoácidos (M1-K448)
Neurotoxina botulínica tipo B	- restos de aminoácidos (M1-K441)
Neurotoxina botulínica tipo C	- restos de aminoácidos (M1-K449)
Neurotoxina botulínica tipo D	- restos de aminoácidos (M1-R445)
Neurotoxina botulínica tipo E	- restos de aminoácidos (M1-R422)
Neurotoxina botulínica tipo F	- restos de aminoácidos (M1-K439)
Neurotoxina botulínica tipo G	- restos de aminoácidos (M1-K446)
Neurotoxina tetánica	- restos de aminoácidos (M1-A457)

10

15

20

25

Una variedad de fragmentos de toxina clostridial que comprenden la cadena ligera pueden ser útiles en aspectos de la presente invención con la condición de que estos fragmentos de cadena ligera se puedan dirigir específicamente a los componentes del centro del aparato de liberación de neurotransmisores y así participar en la ejecución del mecanismo celular global mediante el cual una toxina clostridial escinde proteolíticamente un sustrato. Las cadenas ligeras de toxinas clostridiales tienen aproximadamente 420-460 aminoácidos de longitud y comprenden un dominio enzimático. La investigación ha demostrado que la longitud total de una cadena ligera de toxina clostridial no es necesaria para la actividad enzimática del dominio enzimático. Como ejemplo no limitante, los primeros ocho aminoácidos de la cadena ligera de BoNT/A no son necesarios para la actividad enzimática. Como otro ejemplo no limitante, los primeros ocho aminoácidos de la cadena ligera de TeNT no son necesarios para la actividad enzimática. Como un ejemplo no limitante, los últimos 32 aminoácidos de la cadena ligera de BoNT/A (restos 417-448) no son necesarios para la actividad enzimática. Como otro ejemplo no limitante, los últimos 31 aminoácidos de la cadena ligera de TeNT (restos 427-457) no son necesarios para la actividad enzimática. Por lo tanto, aspectos de esta realización pueden incluir cadenas ligeras de toxinas clostridiales que comprenden un dominio enzimático que tiene una longitud de, por ejemplo, al menos 350 aminoácidos, al menos 375 aminoácidos, al menos 400 aminoácidos, al menos 425 aminoácidos y al menos 450 aminoácidos. Otros aspectos de esta realización pueden incluir cadenas ligeras de toxinas clostridiales que comprenden un dominio enzimático que tiene una longitud de, por ejemplo, como máximo 350 aminoácidos, como máximo 375 aminoácidos, como máximo 400 aminoácidos, como máximo 425 aminoácidos y como máximo 450 aminoácidos.

Se describen más ejemplos de proteasas no citotóxicas adecuadas en detalle en el documento WO 2007/106115.

30

En una realización, la proteasa no citotóxica escinde una proteína SNARE no neuronal tal como una proteína SNAP-23. En una realización, la proteasa no citotóxica es una cadena L de toxina botulínica modificada capaz de escindir SNAP-23. Un ejemplo de dicha cadena L modificada es descrito por Chen y Barbieri, PNAS, vol. 106, no. 23, p9180-9184, 2009.

En una realización, la proteasa no citotóxica es una proteasa BoNT/A, BoNT/C o BoNT/E, y el motivo de SNARE preferido es un motivo SNAP (p. ej., SNAP 25).

En otra realización, la proteasa no citotóxica es una proteasa BoNT/B, BoNT/D, BoNT/F o BoNT/G o neurotoxina tetánica (TeNT), y el motivo de SNARE preferido es un motivo VAMP.

5 En otra realización, la proteasa no citotóxica es una proteasa BoNT/C₁, y el motivo de SNARE preferido es un motivo de syntaxina.

Las proteasas no citotóxicas de la presente invención reconocen secuencias de sitios de escisión diferentes y, por lo tanto, tienen especificidades de escisión ligeramente diferentes.

Proteasa no citotóxica	Secuencia de reconocimiento del sitio de escisión						
	P4-P3-P2-P1-↓-P1'-P2'-P3'						
	P4	P3	P2	P1	P1'	P2'	P3'
BoNT/A	E	A	N	Q	R	A	T
BoNT/B	G	A	S	Q	F	E	T
BoNT/C	A	N	Q	R	A	T	K
BoNT/C	D	T	K	K	A	V	K
BoNT/D	R	D	Q	K	L	S	E
BoNT/E	Q	I	D	R	I	M	E
BoNT/F	E	R	D	Q	K	L	S
BoNT/G	E	T	S	A	A	K	I
TeNT	G	A	S	Q	F	E	T
Proteasa IgA	S	T	P	P	T	P	S
Antareasa	I	K	R	K	Y	W	W

A modo de ejemplo adicional, se hace referencia a las siguientes secuencias de reconocimiento y sitios de escisión:

Proteasa no citotóxica	Secuencia de reconocimiento del sitio de escisión						
	P4-P3-P2-P1-↓-P1'-P2'-P3'						
	P4	P3	P2	P1	P1'	P2'	P3'
BoNT/A	E	A	N	Q	R	A	T
	A	N	Q	R	A	T	K
	E	A	N	Q	R	A	T
	F	A	N	Q	R	A	T
	E	A	N	Q	R	A	T
	E	A	N	Q	R	A	I
	E	A	N	K	A	T	K
	E	A	N	K	H	A	T
	E	A	N	K	H	A	N
				Q		R	
			K		H		

BoNT/C	D	E	A	N	Q	R	A
	E	A	N	Q	R	A	T
	A	N	Q	R	A	T	K
	N	Q	R	A	T	K	M
	A	N	Q	R	A	I	K
	A	N	Q	R	A	H	Q
	D	T	K	K	A	V	K
	K	T	K	K	A	V	K
	E	T	K	K	A	I	K
	E	T	K	R	A	M	K
	D	T	K	K	A	V	R
	D	T	K	K	A	L	K
	D	T	K	K	A	M	K
	E	S	K	K	A	V	K
	E	T	K	K	A	M	K
	E	T	K	K	A	V	K
				K	A		
				R	A		
BoNT/E	Q	I	D	R	I	M	E
	Q	I	Q	K	I	T	E
	Q	I	D	R	I	V	E
	Q	F	D	R	I	M	D
	Q	F	D	R	I	M	E
	Q	L	D	R	I	H	D
	Q	I	D	R	I	M	D
	Q	V	D	R	I	Q	Q
				R	I		
BoNT/B	G	A	S	Q	F	E	T
	A	G	A	S	Q	F	E
	G	A	S	Q	F	E	S
	Q	A	S	Q	F	E	S
	G	A	S	Q	G	E	T
	G	A	S	Q	F	E	Q

ES 2 682 679 T3

	Q	A	S	Q	F	E	A
	G	A	S	Q	F	Q	Q
	G	A	S	Q	F	E	A
				Q	F		
BoNT/D	R	D	Q	K	L	S	E
	R	D	Q	K	I	S	E
	K	D	Q	K	L	A	E
				K	L		
BoNT/F	E	R	D	Q	K	L	S
	V	L	E	R	D	Q	K
	E	R	D	Q	K	I	S
	E	R	D	Q	A	L	S
	E	K	D	Q	K	L	A
				Q	K		
BoNT/G	E	S	S	A	A	K	I
	E	T	S	A	A	K	I
	E	S	S	A	A	K	L
	E	T	S	A	A	K	L
				A	A		
TeNT	G	A	S	Q	F	E	T
	G	A	S	Q	G	E	T
	G	A	S	Q	F	E	Q
	Q	A	S	Q	F	E	A
	G	A	S	Q	F	E	S
	Q	A	S	Q	F	E	S
	G	A	S	Q	F	Q	Q
	G	A	S	Q	F	E	A
				Q	F		
Proteasa IgA	S	T	P	P	T	P	S
Antareasa	I	K	R	K	Y	W	W

Los polipéptidos de la presente invención, especialmente el componente proteasa de los mismos, pueden estar PEGilados, lo que puede ayudar a aumentar la estabilidad, por ejemplo, la duración de la acción del componente proteasa. La PEGilación es particularmente preferida cuando la proteasa comprende una proteasa BoNT/A, B o C₁. La PEGilación incluye preferiblemente la adición de PEG al extremo N del componente proteasa. A modo de ejemplo, el extremo N de una proteasa se puede extender con uno o más restos de aminoácidos (p. ej., cisteína), que pueden ser iguales o diferentes. Uno o más de dichos restos de aminoácidos pueden tener su propia molécula de PEG unida (p. ej. unida de forma covalente) a la misma. Un ejemplo de esta tecnología se describe en el documento WO2007/104567.

Un dominio de translocación es una molécula que permite la translocación de una proteasa a una célula diana de modo que se produce una expresión funcional de actividad de proteasa dentro del citosol de la célula diana. Si cualquier molécula (p. ej., una proteína o péptido) posee la función de translocación requerida de la presente invención se puede confirmar por cualquiera de una serie de ensayos convencionales.

Por ejemplo, Shone C. (1987) describe un ensayo *in vitro* que emplea liposomas, que son provocados con una molécula de prueba. La presencia de la función de translocación requerida se confirma mediante la liberación desde los liposomas de K⁺ y/o NAD marcado, que se pueden controlar fácilmente [véase Shone C. (1987) Eur. J. Biochem; vol. 167 (1): pp. 175-180].

Un ejemplo adicional lo proporciona Blaustein R. (1987), que describe un ensayo simple *in vitro* que emplea membranas bicapa planas fosfolipídicas. Las membranas son provocadas con una molécula de prueba y la función de translocación requerida se confirma mediante un aumento en la conductancia a través de dichas membranas [véase Blaustein (1987) FEBS Letts; vol. 226, no. 1: pp. 115-120].

La metodología adicional para permitir la evaluación de la fusión de la membrana y por lo tanto la identificación de dominios de translocación adecuados para uso en la presente invención se proporciona por Methods in Enzymology Vol 220 and 221, Membrane Fusion Techniques, Parts A and B, Academic Press 1993.

La presente invención también abarca dominios de translocación variante, siempre que los dominios variantes todavía demuestren la actividad de translocación requerida. A modo de ejemplo, una variante puede tener al menos 70%, preferiblemente al menos 80%, más preferiblemente al menos 90%, y lo más preferiblemente al menos 95% o al menos 98% de homología de secuencia de aminoácidos con un dominio de translocación de referencia. El término fragmento, cuando se utiliza en relación con un dominio de translocación, significa un péptido que tiene al menos 20, preferiblemente al menos 40, más preferiblemente al menos 80, y lo más preferiblemente al menos 100 resitos de aminoácidos del dominio de translocación de referencia. En el caso de un dominio de translocación clostridial, el fragmento tiene preferiblemente al menos 100, preferiblemente al menos 150, más preferiblemente al menos 200, y lo más preferiblemente al menos 250 restos de aminoácidos del dominio de translocación de referencia (p. ej., dominio H_N). Como con el componente 'fragmento' de TM (discutido anteriormente), los 'fragmentos' de translocación de la presente invención abarcan fragmentos de dominios de translocación variantes basados en las secuencias de referencia.

El dominio de translocación es preferiblemente capaz de formar poros permeables a iones en membranas lipídicas en condiciones de pH bajo. Preferiblemente, se ha encontrado que utiliza solo aquellas porciones de la molécula de proteína capaces de formación de poros dentro de la membrana endosomal.

El dominio de translocación se puede obtener de una fuente de proteína microbiana, en particular de una fuente proteica bacteriana o viral. Por lo tanto, en una realización, el dominio de translocación es un dominio de translocación de una enzima, tal como una toxina bacteriana o proteína viral.

Está bien documentado que ciertos dominios de moléculas de toxinas bacterianas son capaces de formar tales poros. También se sabe que ciertos dominios de translocación de proteínas de fusión de membrana expresadas por virus son capaces de formar tales poros. Tales dominios se pueden emplear en la presente invención.

El dominio de translocación puede ser de origen clostridial, tal como el dominio H_N (o un componente funcional del mismo). H_N significa una porción o fragmento de la cadena H de una neurotoxina clostridial aproximadamente equivalente a la mitad amino terminal de la cadena H, o el dominio correspondiente a ese fragmento en la cadena H intacta. A este respecto, si se desea eliminar la función de unión a células H_C, esto se puede hacer mediante la eliminación de la secuencia de aminoácidos H_C o H_{CC} (ya sea en el nivel de síntesis de ADN, o en el nivel postsíntesis mediante tratamiento con nucleasa o proteasa). Alternativamente, la función H_C puede ser inactivada por un tratamiento químico o biológico.

Los ejemplos de dominios de translocación adecuados (referencia) incluyen:

Neurotoxina botulínica tipo A - restos de aminoácidos (449-871)

Neurotoxina botulínica tipo B - restos de aminoácidos (441-858)

Neurotoxina botulínica tipo C	- restos de aminoácidos (442-866)
Neurotoxina botulínica tipo D	- restos de aminoácidos (446-862)
Neurotoxina botulínica tipo E	- restos de aminoácidos (423-845)
Neurotoxina botulínica tipo F	- restos de aminoácidos (440-864)
Neurotoxina botulínica tipo G	- restos de aminoácidos (442-863)
Neurotoxina tetánica	- restos de aminoácidos (458-879)

La secuencia de referencia identificada anteriormente se debería considerar una guía ya que pueden ocurrir ligeras variaciones según los sub-serotipos. A modo de ejemplo, el documento US 2007/0166332 (incorporado aquí por referencia a la misma) cita secuencias clostridiales ligeramente diferentes:

Neurotoxina botulínica tipo A	- restos de aminoácidos (A449-K871)
Neurotoxina botulínica tipo B	- restos de aminoácidos (A442-S858)
Neurotoxina botulínica tipo C	- restos de aminoácidos (T450-N866)
Neurotoxina botulínica tipo D	- restos de aminoácidos (D446-N862)
Neurotoxina botulínica tipo E	- restos de aminoácidos (K423-K845)
Neurotoxina botulínica tipo F	- restos de aminoácidos (A440-K864)
Neurotoxina botulínica tipo G	- restos de aminoácidos (S447-S863)
Neurotoxina tetánica	- restos de aminoácidos (S458-V879)

Otros ejemplos de dominios de translocación adecuados se describen en detalle en el documento WO 2007/106115.

En el contexto de la presente invención, una variedad de regiones H_N de toxina clostridial que comprenden un dominio de translocación pueden ser útiles en aspectos de la presente invención con la condición de que estos fragmentos activos puedan facilitar la liberación de una proteasa no citotóxica (p. ej., una cadena L clostridial) de vesículas intracelulares en el citoplasma de la célula diana y así participar en la ejecución del mecanismo celular global mediante el cual una toxina clostridial escinde proteolíticamente un sustrato. Las regiones H_N de las cadenas pesadas de toxinas clostridiales tienen aproximadamente 410-430 aminoácidos de longitud y comprenden un dominio de translocación. La investigación ha demostrado que la longitud total de una región H_N de una cadena pesada de toxina clostridial no es necesaria para la actividad de translocación del dominio de translocación. Por lo tanto, los aspectos de esta realización pueden incluir regiones H_N de toxina clostridial que comprenden un dominio de translocación que tiene una longitud de, por ejemplo, al menos 350 aminoácidos, al menos 375 aminoácidos, al menos 400 aminoácidos y al menos 425 aminoácidos. Otros aspectos de esta realización pueden incluir regiones H_N de toxina clostridial que comprenden un dominio de translocación que tiene una longitud de, por ejemplo, como máximo 350 aminoácidos, como máximo 375 aminoácidos, como máximo 400 aminoácidos y como máximo 425 aminoácidos.

Para más detalles sobre la base genética de la producción de toxinas en *Clostridium botulinum* y *C. tetani*, nos referimos a Henderson et al (1997) en The Clostridia: Molecular Biology and Pathogenesis, Academic press.

El término H_N abarca porciones de neurotoxina H_N de origen natural, y porciones de H_N modificadas que tienen secuencias de aminoácidos que no son de origen natural y/o restos de aminoácidos sintéticos, siempre que las porciones de H_N modificadas todavía demuestren la función de translocación mencionada anteriormente.

Alternativamente, el dominio de translocación puede ser de origen no clostridial. Ejemplos de orígenes de dominio de translocación no clostridial (referencia) incluyen, pero no se limitan a, el dominio de translocación de la toxina diftérica [O = Keefe et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1992) 89, 6202 - 6206; Silverman et al., J. Biol. Chem. (1993) 269, 22524 - 22532; y London, E. (1992) Biochem. Biophys. Acta., 1112, pp.25-51], el dominio de translocación de la exotoxina tipo A de Pseudomonas [Prior et al. Biochemistry (1992) 31, 355-3559], los dominios de translocación de la toxina del ántrax [Blanke et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1996) 93, 8437-8442], una variedad de péptidos fusogénicos o hidrófobos de función de translocación [Plank et al. J. Biol. Chem. (1994) 269, 12918 - 12924; y Wagner et al (1992) PNAS, 89, pp.7934-7938], y péptidos anfífilicos [Murata et al (1992) Biochem., 31, pp. 1986-1992]. El dominio de translocación puede reflejar el dominio de translocación presente en una proteína de origen

natural, o puede incluir variaciones de aminoácidos siempre que las variaciones no destruyan la capacidad de translocación del dominio de translocación.

Ejemplos particulares de dominios de translocación virales (de referencia) adecuados para uso en la presente invención incluyen ciertos dominios de translocación de proteínas de fusión de membrana expresadas por virus. Por ejemplo, Wagner et al. (1992) y Murata et al. (1992) describen la función de translocación (es decir, fusión de membrana y vesiculación) de varios péptidos anfifílicos y fusogénicos derivados de la región N-terminal de la hemaglutinina del virus de la gripe. Otras proteínas de fusión de membrana expresadas por virus conocidas por tener la actividad de translocación deseada son un dominio de translocación de un péptido fusogénico del virus del bosque Semliki (SFV, por sus siglas en inglés), un dominio de translocación de la glicoproteína G del virus de la estomatitis vesicular (VSV, por sus siglas en inglés), un dominio de translocación de la proteína F del virus SER y un dominio de translocación de la glicoproteína de la envoltura del espumavirus. Las proteínas Aspike codificadas por virus tienen una aplicación particular en el contexto de la presente invención, por ejemplo, la proteína E1 de SFV y la proteína G de la proteína G de VSV.

El uso de los dominios de translocación (de referencia) enumerados en la tabla (a continuación) incluye el uso de variantes de secuencia de los mismos. Una variante puede comprender una o más sustituciones conservadoras de ácidos nucleicos y/o deleciones o inserciones de ácidos nucleicos, con la condición de que la variante posea la función de translocación requerida. Una variante también puede comprender una o más sustituciones de aminoácidos y/o deleciones o inserciones de aminoácidos, siempre que la variante posea la función de translocación requerida.

Origen de dominio de translocación	Restos de aminoácidos	Bibliografía
Toxina diftérica	194-80	Silverman et al., 1994, J. Biol. Chem. 269, 22524-22532 London E., 1992, Biochem. Biophys. Acta., 1113, 25-51
Dominio II de la exotoxina de pseudomonas	405-613	Prior et al., 1992, Biochemistry 31,3555-3559 Kihara & Pastan, 1994, Bioconj Chem. 5, 532-538
Hemaglutinina del virus Influenza	GLFGAIAGFIENGW EGMIDGWYG y variantes de los mismos	Plank et al., 1994, J. Biol. Chem. 269, 12918-12924 Wagner et al., 1992, PNAS, 89, 7934-7938 Murata et al., 1992, Biochemistry 31, 1986-1992
Proteína fusogénica del virus del bosque Semliki	Dominio de translocación	Kielian et al., 1996, J Cell Biol. 134(4), 863-872
Glicoproteína G del virus de la estomatitis vesicular	118-139	Yao et al., 2003, Virology 310(2), 319-332
Proteína F del virus SER	Dominio de translocación	Seth et al., 2003, J Virol 77(11) 6520-6527
Glicoproteína de la envoltura del espumavirus	Dominio de translocación	Picard-Maureau et al., 2003, J Virol. 77(8), 4722-4730

Los polipéptidos de la presente invención pueden comprender además un dominio facilitador de translocación. Dicho dominio facilita la liberación de la proteasa no citotóxica en el citosol de la célula diana y se describen, por ejemplo, en los documentos WO 08/008803 y WO 08/008805.

A modo de ejemplo, los dominios facilitadores de translocación incluyen un dominio peptídico fusogénico de virus con envoltura, por ejemplo, dominios peptídicos fusogénicos adecuados incluyen dominio peptídico fusogénico del virus de la gripe (p. ej., dominio peptídico fusogénico del virus influenza A de 23 aminoácidos), dominio peptídico fusogénico alfavirus (p. ej. dominio peptídico fusogénico del virus del bosque Semliki de 26 aminoácidos), dominio peptídico fusogénico vesiculovirus (p. ej., dominio peptídico fusogénico del virus de la estomatitis vesicular de 21 aminoácidos), dominio peptídico fusogénico del respiravirus (p. ej. dominio peptídico fusogénico del virus Sendai de 25 aminoácidos), dominio peptídico fusogénico del morbilivirus (p.ej. dominio peptídico fusógeno del virus del moquillo canino de 25 aminoácidos), dominio peptídico fusogénico del avulavirus (p. ej. dominio peptídico fusogénico del virus de la enfermedad de Newcastle de 25 aminoácidos), dominio peptídico fusogénico del henipavirus (p. ej. dominio peptídico fusogénico del virus Hendra de 25 aminoácidos) dominio peptídico fusogénico del metapneumovirus (p. ej., dominio peptídico fusogénico del metapneumovirus humano de 25 aminoácidos) o dominio

peptídico fusogénico del espumavirus tal como dominio peptídico fusogénico del espumavirus de simio; o fragmentos o variantes de los mismos.

5 A modo de ejemplo adicional, un dominio facilitador de translocación puede comprender un dominio H_{CN} de toxina clostridial o un fragmento o variante del mismo. Más detalladamente, un dominio facilitador de translocación de H_{CN} de la toxina clostridial puede tener una longitud de al menos 200 aminoácidos, al menos 225 aminoácidos, al menos 250 aminoácidos, al menos 275 aminoácidos. A este respecto, un dominio facilitador de translocación de H_{CN} de la toxina clostridial tiene preferiblemente una longitud de como máximo 200 aminoácidos, como máximo 225 aminoácidos, como máximo 250 aminoácidos, o como máximo 275 aminoácidos. Los ejemplos específicos (de

10 referencia) incluyen:

Neurotoxina botulínica tipo A	- restos de aminoácidos (872-1110)
Neurotoxina botulínica tipo B	- restos de aminoácidos (859-1097)
Neurotoxina botulínica tipo C	- restos de aminoácidos (867-1111)
Neurotoxina botulínica tipo D	- restos de aminoácidos (863-1098)
Neurotoxina botulínica tipo E	- restos de aminoácidos (846-1085)
Neurotoxina botulínica tipo F	- restos de aminoácidos (865-1105)
Neurotoxina botulínica tipo G	- restos de aminoácidos (864-1105)
Neurotoxina tetánica	- restos de aminoácidos (880-1127)

Las posiciones de secuencia anteriores pueden variar un poco según el serotipo/subtipo, y otros ejemplos de dominios H_{CN} de toxina clostridial (referencia) adecuados incluyen:

Neurotoxina botulínica tipo A	- restos de aminoácidos (874-1110)
Neurotoxina botulínica tipo B	- restos de aminoácidos (861-1097)
Neurotoxina botulínica tipo C	- restos de aminoácidos (869-1111)
Neurotoxina botulínica tipo D	- restos de aminoácidos (865-1098)
Neurotoxina botulínica tipo E	- restos de aminoácidos (848-1085)
Neurotoxina botulínica tipo F	- restos de aminoácidos (867-1105)
Neurotoxina botulínica tipo G	- restos de aminoácidos (866-1105)
Neurotoxina tetánica	- restos de aminoácidos (882-1127)

15 Cualquiera de los dominios facilitadores descritos anteriormente se puede combinar con cualquiera de los péptidos con dominio de translocación descritos anteriormente que son adecuados para utilizar en la presente invención. Por lo tanto, a modo de ejemplo, un dominio facilitador no clostridial se puede combinar con un péptido con dominio de translocación no clostridial o con un péptido con dominio de translocación clostridial. Alternativamente, un dominio

20 facilitador de translocación H_{CN} de toxina clostridial se puede combinar con un péptido con dominio de translocación no clostridial. Alternativamente, se puede combinar un dominio facilitador H_{CN} de toxina clostridial o con un péptido con dominio de translocación clostridial, cuyos ejemplos incluyen:

Neurotoxina botulínica tipo A	- restos de aminoácidos (449-1110)
Neurotoxina botulínica tipo B	- restos de aminoácidos (442-1097)
Neurotoxina botulínica tipo C	- restos de aminoácidos (450-1111)
Neurotoxina botulínica tipo D	- restos de aminoácidos (446-1098)
Neurotoxina botulínica tipo E	- restos de aminoácidos (423-1085)
Neurotoxina botulínica tipo F	- restos de aminoácidos (440-1105)

Neurotoxina botulínica tipo G	- restos de aminoácidos (447-1105)
Neurotoxina tetánica	- restos de aminoácidos (458-1127)

Homología de secuencia

- Se puede utilizar cualquiera de una variedad de métodos de alineación de secuencias para determinar el porcentaje de identidad, que incluye, sin limitación, métodos globales, métodos locales y métodos híbridos, tales como, p. ej., métodos de aproximación por segmentos. Los protocolos para determinar el porcentaje de identidad son procedimientos habituales dentro del alcance de un experto en la técnica. Los métodos globales alinean las secuencias desde el principio hasta el final de la molécula y determinan la mejor alineación sumando puntuaciones de pares de restos individuales e imponiendo penalizaciones por huecos. Los métodos no limitantes incluyen, p. ej., CLUSTAL W, véase, p. ej., Julie D. Thompson et al., CLUSTAL W: Improving the Sensitivity of Progressive Multiple Sequence Alignment Through Sequence Weighting, Position- Specific Gap Penalties and Weight Matrix Choice, 22(22) Nucleic Acids Research 4673-4680 (1994); y refinamiento iterativo, véase, p. ej., Osamu Gotoh, Significant Improvement in Accuracy of Multiple Protein. Sequence Alignments by Iterative Refinement as Assessed by Reference to Structural Alignments, 264(4) J. Mol. Biol. 823-838 (1996). Los métodos locales alinean las secuencias identificando uno o más motivos conservados compartidos por todas las secuencias de entrada. Métodos no limitantes incluyen p. ej., Match-box, véase, p. ej., Eric Depiereux and Ernest Feytmans, Match-Box: A Fundamentally New Algorithm for the Simultaneous Alignment of Several Protein Sequences, 8(5) CABIOS 501 -509 (1992); Gibbs sampling, véase, p. ej., C. E. Lawrence et al., Detecting Subtle Sequence Signals: A Gibbs Sampling Strategy for Multiple Alignment, 262(5131) Science 208-214 (1993); Align-M, véase, p. ej., Ivo Van Walle et al., Align-M - A New Algorithm for Multiple Alignment of Highly Divergent Sequences, 20(9) Bioinformatics:1428-1435 (2004).

- Por lo tanto, el porcentaje de identidad de secuencia se determina por métodos convencionales. Véase, por ejemplo, Altschul et al., Bull. Math. Bio. 48: 603-16, 1986 and Henikoff and Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915-19, 1992. Brevemente, dos secuencias de aminoácidos se alinean para optimizar las puntuaciones de alineación utilizando una penalización por abrir hueco de 10, una penalización por extender hueco de 1, y la matriz de puntuación "blosum 62" de Henikoff y Henikoff (ibid) como se muestra a continuación (los aminoácidos están indicados por los códigos estándar de una letra).

Puntuaciones de alineación para determinar la identidad de secuencia

	A	R	N	D	C	Q	E	G	H	I	L	K	M	F	P	S	T	W	Y	V
A	4																			
R	-1	5																		
N	-2	0	6																	
D	-2	-2	1	6																
C	0	-3	-3	-3	9															
Q	-1	1	0	0	-3	5														
E	-1	0	0	2	-4	2	5													
G	0	-2	0	-1	-3	-2	-2	6												
H	-2	0	1	-1	-3	0	0	-2	8											
I	-1	-3	-3	-3	-1	-3	-3	-4	-3	4										
L	-1	-2	-3	-4	-1	-2	-3	-4	-3	2	4									
K	-1	2	0	-1	-3	1	1	-2	-1	-3	-2	5								
M	-1	-1	-2	-3	-1	0	-2	-3	-2	1	2	-1	5							
F	-2	-3	-3	-3	-2	-3	-3	-3	-1	0	0	-3	0	6						
P	-1	-2	-2	-1	-3	-1	-1	-2	-2	-3	-3	-1	-2	-4	7					
S	1	-1	1	0	-1	0	0	0	-1	-2	-2	0	-1	-2	-1	4				
T	0	-1	0	-1	-1	-1	-1	-2	-2	-1	-1	-1	-1	-2	-1	1	5			
W	-3	-3	-4	-4	-2	-2	-3	-2	-2	-3	-2	-3	-1	1	-4	-3	-2	11		
Y	-2	-2	-2	-3	-2	-1	-2	-3	2	-1	-1	-2	-1	3	-3	-2	-2	2	7	
V	0	-3	-3	-3	-1	-2	-2	-3	-3	3	1	-2	1	-1	-2	-2	0	-3	-1	4

El porcentaje de identidad es entonces calculado como:

$$\frac{\text{Número total de coincidencias}}{\text{longitud de la secuencia más larga} - \text{más el número de huecos introducidos en la secuencia más larga para alinear las dos secuencias}} \times 100$$

- 5 Los polipéptidos sustancialmente homólogos se caracterizan por tener una o más sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos. Estos cambios son preferiblemente de naturaleza menor, es decir, sustituciones conservadoras de aminoácidos (véase a continuación) y otras sustituciones que no afectan significativamente al plegamiento o actividad del polipéptido; pequeñas deleciones, típicamente de uno a aproximadamente 30 aminoácidos; y pequeñas extensiones amino o carboxilo terminales, tales como un resto de metionina amino terminal, un péptido conector pequeño de hasta aproximadamente 20-25 restos o una etiqueta de afinidad.

Sustituciones conservadoras de aminoácidos

Básicos:	arginina
	lisina
	histidina
Ácidos:	ácido glutáminico
	ácido aspártico
Polares:	glutamina
	asparagina
Hidrofóbicos:	leucina
	isoleucina
	valina
Aromáticos:	fenilalanina
	triptófano
	tirosina
Pequeños:	glicina
	alanina
	serina
	treonina
	metionina

10

Además de los 20 aminoácidos estándar, los aminoácidos no estándar (tal como 4-hidroxiprolina, 6-N-metil-lisina, ácido 2-aminoisobutírico, isovalina y α -metil serina) se pueden sustituir por restos de aminoácidos de los polipéptidos de la presente invención. Un número limitado de aminoácidos no conservados, aminoácidos que no están codificados por el código genético y aminoácidos no naturales se pueden sustituir por restos de aminoácidos de polipéptidos clostridiales. Los polipéptidos de la presente invención también pueden comprender restos de aminoácidos no presentes de forma natural.

15

20

Los aminoácidos no presentes de forma natural incluyen, sin limitación, trans-3-metilprolina, 2,4-metano-prolina, cis-4-hidroxiprolina, trans-4-hidroxiprolina, N-metilglicina, alo-treonina, metil-treonina, hidroxietilcisteína, hidroxietilhomo-cisteína, nitro-glutamina, homoglutamina, ácido pipercolico, tert-leucina, norvalina, 2-azafenilalanina, 3-azafenil-alanina, 4-azafenilalanina y 4-fluorofenilalanina. Se conocen varios métodos en la técnica para incorporar restos de aminoácidos no presentes de forma natural en las proteínas. Por ejemplo, se puede emplear un sistema *in vitro* en donde las mutaciones sin sentido se suprimen utilizando ARNt supresores químicamente aminoacilados. Los métodos para sintetizar aminoácidos y ARNt aminoacilante son conocidos en la técnica. La transcripción y

traducción de plásmidos que contienen mutaciones sin sentido se lleva a cabo en un sistema libre de células que comprende un extracto de *E. coli* S30 y enzimas disponibles comercialmente y otros reactivos. Las proteínas se purifican mediante cromatografía. Véase, por ejemplo, Robertson et al., J. Am. Chem. Soc. 113:2722, 1991; Ellman et al., Methods Enzymol. 202:301, 1991; Chung et al., Science 259:806-9, 1993; y Chung et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:10145-9, 1993). En un segundo método, la traducción se lleva a cabo en oocitos de *Xenopus* mediante microinyección de ARNm mutado y ARNt supresores químicamente aminoacilados (Turcatti et al., J. Biol. Chem. 271: 19991-8, 1996). Dentro de un tercer método, las células de *E. coli* se cultivan en ausencia de un aminoácido natural que se va a reemplazar (p. ej., fenilalanina) y en presencia del o de los aminoácidos no presentes de forma natural deseados (p. ej. 2-azafenilalanina, 3-azafenilalanina, 4-azafenilalanina o 4-fluorofenilalanina). El aminoácido no presente de forma natural se incorpora en el polipéptido en lugar de su equivalente natural. Véase Koide et al., Biochem. 33:7470-6, 1994. Los restos de aminoácidos de origen natural se pueden convertir en especies no presentes de forma natural mediante modificación química *in vitro*. La modificación química se puede combinar con mutagénesis sitio-dirigida para expandir aún más el rango de sustituciones (Wynn and Richards, Protein Sci. 2:395-403, 1993).

Un número limitado de aminoácidos no conservativos, aminoácidos que no están codificados por el código genético, aminoácidos no presentes de forma natural y aminoácidos no naturales se pueden sustituir por restos de aminoácidos de polipéptidos de la presente invención.

Los aminoácidos esenciales en los polipéptidos de la presente invención se pueden identificar según procedimientos conocidos en la técnica, tales como la mutagénesis sitio-dirigida o la mutagénesis por barrido de alanina. (Cunningham and Wells, Science 244: 1081-5, 1989). Los sitios de interacción biológica también se pueden determinar por análisis físico de la estructura, según lo determinado por técnicas tales como resonancia magnética nuclear, cristalografía, difracción de electrones o marcaje por fotoafinidad, junto con la mutación de los supuestos aminoácidos del sitio de contacto. Véase, por ejemplo, de Vos et al., Science 255:306-12, 1992; Smith et al., J. Mol. Biol. 224:899-904, 1992; Wlodaver et al., FEBS Lett. 309:59-64, 1992. Las identidades de aminoácidos esenciales también se pueden inferir a partir del análisis de homologías con componentes relacionados (p. ej., los componentes de translocación o proteasas) de los polipéptidos de la presente invención.

Se pueden hacer y probar múltiples sustituciones de aminoácidos utilizando métodos conocidos de mutagénesis y cribado, tales como los descritos por Reidhaar-Olson y Sauer (Science 241:53-7, 1988) o Bowie y Sauer (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:2152-6, 1989). Brevemente, estos autores describen métodos para aleatorizar simultáneamente dos o más posiciones en un polipéptido, seleccionar un polipéptido funcional y luego secuenciar los polipéptidos mutagenizados para determinar el espectro de sustituciones permitidas en cada posición. Otros métodos que se pueden utilizar incluyen expresión en fago (p. ej. Lowman et al., Biochem. 30:10832-7, 1991; Ladner et al., Patente de EE:UU. No. 5.223.409; Huse, WIPO Publication WO 92/06204) y mutagénesis sitio-dirigida (Derbyshire et al., Gene 46:145, 1986; Ner et al., DNA 7:127, 1988).

Se pueden hacer y analizar múltiples sustituciones de aminoácidos utilizando métodos conocidos de mutagénesis y cribado, tales como los descritos por Reidhaar-Olson y Sauer (Science 241:53-7, 1988) o Bowie y Sauer (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:2152-6, 1989). Brevemente, estos autores describen métodos para aleatorizar simultáneamente dos o más posiciones en un polipéptido, seleccionar un polipéptido funcional y luego secuenciar los polipéptidos mutagenizados para determinar el espectro de sustituciones permitidas en cada posición. Otros métodos que se pueden utilizar incluyen expresión en fago (p. ej. Lowman et al., Biochem. 30:10832-7, 1991; Ladner et al., Patente de EE:UU. No. 5.223.409; Huse, WIPO Publication WO 92/06204) y mutagénesis sitio-dirigida (Derbyshire et al., Gene 46:145, 1986; Ner et al., DNA 7:127, 1988).

Ejemplos

Se prepara un polipéptido para la administración a un paciente que sufre picor, proporcionando un método para la supresión o el tratamiento del picor. Como se define en la presente invención, el componente conector selectivo (TM) del polipéptido preparado se une a un receptor acoplado a proteína G, en particular a un receptor acoplado a proteína G Mrgpr, que está presente en la neurona DRG específica del picor o pruriceptor. A continuación, el componente de translocación efectúa el transporte del componente proteasa no citotóxica del polipéptido, que una vez dentro de la neurona DRG específica del picor o un pruriceptor, inhibe la secreción de neurotransmisores a partir del mismo. De acuerdo con esto, el polipéptido reduce el nivel de neurotransmisor, y es capaz de suprimir o tratar el picor.

Ejemplo 1

Una mujer de 35 años con cáncer de mama tiene un picor crónico debilitante atribuido a una reacción farmacológica para el tratamiento de su enfermedad. El tratamiento es por inyección subcutánea de 0,025 mg/kg de un polipéptido de la presente invención que comprende el ligando BAM₈₋₂₂ (inyección semanal durante un período de seis meses), que conduce a una disminución de la sensación de picor y a una marcada mejoría en la salud. El paciente informa de un alivio efectivo del picor.

Ejemplo 2

- 5 Un paciente de 60 años reporta picor crónico y presenta un caso severo atribuible a enfermedad renal. Se administra una suspensión parenteral de 0,07 mg/kg de un polipéptido de la presente invención que comprende un péptido SLIGRL-NH₂ mediante inyección duodenal laparoscópica (régimen de inyección 6 veces al mes). Los resultados positivos que incluyen picor reducido se dan a conocer en el primer mes de tratamiento.

Ejemplo 3

- 10 Un paciente de 37 años, con antecedentes familiares de psoriasis, sufre picor crónico que está teniendo un efecto significativo en su bienestar físico y calidad de vida. La dosificación semanal de 0,09 mg/kg de un polipéptido de la presente invención que comprende el péptido de $\alpha 2$ -hormona estimulante de melanocitos ($\alpha 2$ -MSH) se administra por vía intravenosa. La gravedad de la psoriasis disminuye y el paciente no informa de sensaciones adicionales de picor durante todo el período de tratamiento.

Ejemplo 4

- 15 Un paciente con VIH de 45 años que padece un picor crónico severo recientemente ha sido diagnosticado con culebrilla, una enfermedad que tiene síntomas que a menudo incluyen picor extremo. Después de muchas noches de insomnio de rascado implacable, se le prescriben inyecciones intravenosas mensuales de 0,05 mg/kg de un polipéptido de la invención que comprende cloroquina (CQ). El paciente informa de una mejor tasa de recuperación y no más sensaciones de picor después de tres meses de tratamiento.

Ejemplo 5

- 20 A una paciente de 6 años con eczema atópico se le prescribe una dosis oral mensual de 0,1 mg/kg de una formulación encapsulada de un polipéptido de la invención que comprende histamina HT1. La paciente informa de una mejoría en su estado después del tratamiento y la desaparición de las áreas rojas de la piel detrás de la rodilla.

Ejemplo 6

- 25 Un hombre de 17 años con síndrome de Jorgen informa de síntomas de picor en los ojos y erupciones cutáneas en las extremidades. El médico prescribe 0,001 mg/kg (inyección laparoscópica local cada 8 semanas) de un polipéptido de la invención que comprende serotonina. En dos meses, el paciente informa de una reducción significativa de la incomodidad.

Ejemplo 7

- 30 Una paciente de 18 años es diagnosticada de urticaria papular después de unas vacaciones en África. Muestra a un especialista numerosas lesiones en las áreas expuestas, particularmente en la parte inferior de las piernas, pero también en los brazos, las mejillas y la cintura. Las pápulas y las cicatrices inflamatorias posteriores son evidentes. Desde el diagnóstico, el paciente experimenta una peor calidad de vida en general. El paciente recibe tratamiento para su picor con inyecciones mensuales de 0,07 mg/kg de un polipéptido de la presente invención que comprende neuropéptidos que terminan en un NPFF/Y-G o un RF/Y-amida. Durante el programa de tratamiento de seis meses, el paciente no informa de más sensaciones de picor.

Ejemplo 8

- 40 Un paciente varón de 59 años con linfoma cutáneo de células B posteriormente desarrolló un sarpullido rojo y piel seca con picor severo que cubre aproximadamente el 80% del cuerpo. El médico del paciente prescribe 0,1 mg/kg de un polipéptido de la invención que comprende capsaicina, administrada por inyección duodenal laparoscópica cada tres meses. Después de una dosis de tratamiento, el paciente informa que no tiene prurito adicional.

Ejemplo 9

- 45 Una paciente de 34 años con erupción polimórfica del embarazo (PEP) presenta picor severo en forma de una erupción con ronchas y áreas inflamadas grandes de la piel en su parte inferior del abdomen y las extremidades. El paciente se trata administrando un parche adhesivo sobre la superficie de su piel, que libera el polipéptido de la invención que comprende cortistatina mediante difusión lenta desde el parche durante un período de 2 semanas. El parche transdérmico se reemplaza a las 12 semanas al final de las cuales la sensación de picor se informa como desaparecida.

Ejemplos de modelos animales

- 50 Los polipéptidos de la invención se prueban como un tratamiento para el picor, mediante el uso de modelos de ratón con dermatitis atópica (DA) inducida por picor como se describe en la presente memoria. Las cepas de ratones BALB/c y C57BL/6 son igualmente adecuadas, como se ejemplifica a continuación.

Ejemplo 10

- 5 Modelo de ratón BALB/c del picor inducido por sensibilización epicutánea repetida (EC) con ovoalbúmina de piel desprendida con cinta. La piel de la espalda de los ratones se rasura y se desprende con cinta 6 veces con cinta 3M, imitando la lesión de la piel causada por el rascado en pacientes con dermatitis atópica (DA). Se colocan 100 mg de OVA en 100 ml de solución salina normal en un parche de 1 x 1 cm de gasa estéril, que se fija a la piel con un vendaje biooclusivo transparente. Esto asegura que el antígeno no es accesible para lamer. Cada ratón tiene un total de tres exposiciones de una semana al parche en el mismo sitio que está separado el uno del otro por intervalos de 2 semanas. Los ratones sensibilizados con EC desarrollan un mayor comportamiento de rascado y su piel desarrolla lesiones caracterizadas por engrosamiento epidérmico y dérmico.

10 Se administra un polipéptido de la invención por vía intradérmica (i.d) en la parte posterior del cuello a intervalos de 1 hora a una concentración de 1 mg/ml. La inyección de PBS se utilizó como control.

- 15 El picor se mide contando el número de "ataques" de rascado antes del tratamiento con un polipéptido de la invención en comparación con después del tratamiento. Un ataque de rascado se define como tres o más movimientos de raspado rápidos individuales con las patas traseras hacia el área alrededor del sitio de inyección (es decir, la parte posterior del cuello). Los resultados muestran una marcada reducción en el rascado post-tratamiento con el polipéptido de la invención.

Ejemplo 11

- 20 Los ratones BALB/c se someten a la aplicación de EC del alérgeno de ácaros recombinante Der p8 y presentan características de dermatitis con hiperplasia epidérmica y espongirosis. Un polipéptido de la invención se administra como anteriormente. Los hallazgos son similares a los observados en el modelo de sensibilización EC con OVA en el que se observa una reducción significativa en el rascado después del tratamiento con el polipéptido de la invención.

Ejemplo 12

- 25 Los ratones BALB/c están expuestos a la infección por *S. aureus*, conocida por exacerbar los síntomas de DA y causar lesiones en la piel. Los resultados de administrar un polipéptido de la invención demuestran un nivel marcadamente reducido de rascado por el sujeto tratado con el polipéptido de la invención en comparación con ratones control.

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido, para uso en la supresión o el tratamiento del picor, en donde el polipéptido comprende:

(i) una proteasa no citotóxica, cuya proteasa es capaz de escindir una proteína SNARE en una neurona DRG específica del picor o un pruriceptor;

(ii) un conector selectivo (TM) que es capaz de unirse a un receptor acoplado a proteína G relacionado con Mas (Mrgpr) en la neurona DRG específica del picor o un pruriceptor, cuyo Mrgpr es capaz de experimentar endocitosis para ser incorporado a un endosoma dentro de una neurona DRG específica del picor o un pruriceptor, y en donde dicha neurona DRG específica del picor o un pruriceptor expresa dicha proteína SNARE; y

(iii) un dominio de translocación que es capaz de translocar la proteasa desde dentro de un endosoma, a través de la membrana endosomal y hacia el citosol de la neurona DRG específica del picor o un pruriceptor;

con la condición de que el polipéptido no sea una molécula de neurotoxina clostridial (holotoxina).

2. El polipéptido para uso según la reivindicación 1, en donde el TM se une a un receptor seleccionado del grupo que comprende MrgprX, MrgprA o MrgprC o análogos de receptor de los mismos.

3. El polipéptido para uso según la reivindicación 1 o 2, donde el TM se selecciona del grupo que consiste en: un péptido de médula suprarrenal bovina (BAM), un péptido de hormona estimulante de melanocitos (MSH), neuropéptidos que terminan en Y-G o Y-amida, una cloroquina (CQ), un péptido que comprende SLIGRLNH₂, histamina, serotonina, capsaicina, cortistatina o truncaciones o análogos peptídicos de los mismos.

4. El polipéptido para uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde el TM se selecciona del grupo que comprende: BAM₈₋₂₂, un α 2-MSH, SLIGRL, NPAF, NPFF, una cloroquina (CQ), una histamina o serotonina, capsaicina, cortistatina o truncaciones o análogos peptídicos de los mismos.

5. El polipéptido para uso según cualquiera de las reivindicaciones previas en donde el TM se une al receptor MrgprX1.

6. El polipéptido para uso según cualquiera de las reivindicaciones previas en donde el TM es el péptido BAM₈₋₂₂, una truncación o análogo peptídico de los mismos.

7. El polipéptido para uso según cualquier reivindicación precedente, en donde el picor es picor independiente de histamina.

8. El polipéptido para uso según cualquier reivindicación precedente, en donde el uso de un analgésico causa, o empeora el picor.

9. El polipéptido para uso según la reivindicación 8, en donde dicho analgésico es un remedio para el dolor opioide.

10. El polipéptido para uso según cualquier reivindicación precedente, en donde el picor es picor crónico, preferiblemente picor crónico resultante de una enfermedad renal, una enfermedad hepática, cáncer o una enfermedad de la piel.

11. Un polipéptido para uso según cualquier reivindicación precedente, en donde la proteasa no citotóxica comprende una cadena L de neurotoxina clostridial o una proteasa IgA.

12. Un polipéptido para uso según cualquier reivindicación precedente, en donde el dominio de translocación comprende un dominio de translocación de neurotoxina clostridial.

13. Un ácido nucleico que codifica un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones previas para uso en la supresión o el tratamiento del picor.

14. Un polipéptido que comprende:

(i) una proteasa no citotóxica, que es capaz de escindir una proteína SNARE en una neurona DRG específica del picor o un pruriceptor;

(ii) un conector selectivo (TM) que es capaz de unirse a un receptor acoplado a proteína G relacionado con Mas (Mrgpr) en la neurona DRG específica del picor o un pruriceptor, cuyo Mrgpr es capaz de experimentar endocitosis para ser incorporado a un endosoma dentro de una neurona DRG específica del picor o un pruriceptor, y en donde dicha neurona DRG específica del picor o un pruriceptor expresa dicha proteína SNARE; y

(iii) un dominio de translocación que es capaz de translocar la proteasa desde dentro de un endosoma, a través de la membrana endosomal y hacia el citosol de la neurona DRG específica del picor o un pruriceptor;

- 5 con la condición de que el polipéptido no sea una molécula de neurotoxina clostridial (holotoxina), y en donde el TM se selecciona del grupo que consiste en: un péptido de hormona estimulante de melanocitos (MSH), neuropéptidos que terminan en Y-G o Y-amida, una cloroquina (CQ), un péptido que comprende SLIGRL-NH₂, histamina, serotonina o truncaciones o análogos peptídicos de los mismos.
15. Un ácido nucleico que codifica un polipéptido según la reivindicación 14.