

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 745 220**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/10** (2006.01)

**A61P 25/00** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.06.2009** **E 14154831 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.08.2019** **EP 2732823**

54 Título: **Modulación del sistema receptor Trpv:receptor de dominio Vps10p para el tratamiento del dolor**

30 Prioridad:

**25.06.2008 DK 200800880**

**25.06.2008 US 75627 P**

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

**28.02.2020**

73 Titular/es:

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

**Ottiliavej 9**

**2500 Valby, DK**

72 Inventor/es:

**NYKJÆR, ANDERS;**

**BJERGGAARD VÆGTER, CHRISTIAN;**

**BJERRUM, OLE y**

**JANSEN, PERNILLE**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 745 220 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Modulación del sistema receptor Trpv:receptor de dominio Vps10p para el tratamiento del dolor

**Campo de la invención**

La presente invención se refiere al campo de la analgesia o alivio del dolor. Específicamente, la presente invención se refiere a un agente para el uso en el tratamiento del dolor incluyendo dolor crónico y dolor agudo.

**Antecedentes de la invención**

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

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

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

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

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

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

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

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

### Analgesia

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

La sensibilización del nivel umbral de dolor que tiene lugar a través de la inflamación e implica una larga fila de mediadores - la llamada sopa inflamatoria, que entre otros incluyen la serotonina, histamina, prostaglandinas, bradiquinina, sustancia P, péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP), factor de crecimiento nervioso (NGF) y diversas citoquinas. En relación a la lesión del nervio la neurotrofina NGF puede ser particularmente importante aunque otros mediadores también pueden participar. NGF es un miembro de la familia de neurotrofinas que comprende NGF, BDNF, NT-3 y NT-4. Las neurotrofinas pueden interactuar con el receptor "no selectivo" p75<sup>NTR</sup>, así como su cognato quinasa del receptor de tirosina; NGF se une preferentemente a los receptores de tirosina quinasa A (TrkA); BDNF y NT4 a TrkB; y la neurotrofina 3 (NT3) a TrkC. Generalmente se ha considerado que estas interacciones son de alta afinidad. Sin embargo, en la realidad, la unión de NGF a TrkA, y de BDNF a TrkB, es de baja afinidad, pero puede ser regulada por la dimerización del receptor, modificaciones estructurales o asociación con p75<sup>NTR</sup>. El receptor p75 puede unirse a cada neurotrofina, y también actúa como un co-receptor para los receptores Trk, sortilina y otros receptores de dominio Vps10p (cf. Fig. 1).

Una vez que NGF se une, puede producirse un evento de dos etapas de TrkA: Primero, en la superficie de las neuronas sensoriales, TrkA interactúa físicamente con TrpV1, un miembro de una gran familia de canales catiónicos no selectivos permeables al calcio, que está implicado en el desarrollo de la hiperalgesia térmica inducida por la lesión de tejidos y la inflamación, y en el dolor crónico y neuropático [13]. La unión de NGF a TrkA potencia fuertemente el influxo de calcio por TrpV1 y la inducción de dolor. En segundo lugar, la unión de NGF a TrkA y p75<sup>NTR</sup> también se traduce en el transporte retrógrado del complejo de nuevo al cuerpo celular de las neuronas donde el mismo modula la actividad y la transcripción de las proteínas importantes para la supervivencia y diferenciación neuronal, pero también de las enzimas y canales iónicos implicados en la transmisión nociceptiva [3,14]. También la microglia puede desempeñar un papel en esta activación [15].

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

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

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

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

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

### Familia del receptor de dominio Vps10p

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

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

### Sortilina

Sortilina, el miembro arquetípico de la familia del receptor de dominio Vps10p también es referido ocasionalmente como receptor Neurotensina 3 (NTR3), glucoproteína 95 (Gp95) o receptor 100 kDa NT. Se accede a la Sortilina humana en virtud del ID de Proteína de Suiza No. Q99523.

Sortilina, (SEC ID N.º. 1) es un receptor de membrana tipo I expresado en un número de tejidos, incluyendo el cerebro, médula espinal, testículos, músculo esquelético y hígado [18-19]. La Sortilina pertenece a una familia de receptores que comprende Sortilina, SorLA [20], SorCS1, SorCS2 y SorCS3.

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

#### 5 SorLA

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

#### 20 SorCS1-3

SorCS 1 (ID de proteínas de Suiza No. Q8WY21), SorCS2 (ID de proteínas de Suiza No Q96PQ0) y SorCS3 (ID de proteínas de Suiza No Q9UPU3) constituyen un subgrupo de proteínas muy similares entre sí que contienen tanto un dominio Vps10p-D y un dominio rico en leucina que bordea el dominio transmembrana [26, 38].

#### TrkA

El receptor de tirosina quinasa, neurotrófico tipo 1, también conocido como NTRK1 (ID de proteínas de Suiza No P04629) y normalmente referido como TrkA (quinasa relacionada con tropomiosina A) es un miembro de la familia del receptor de tirosina quinasa neurotrófico (NTRK). TrkA es el receptor catalítico de alta afinidad para la neurotrofina, factor de crecimiento nervioso, o "NGF". Como tal, el mismo media los múltiples efectos de NGF, que incluye la diferenciación y supervivencia neuronal: en la unión de NGF, TrkA se dimeriza y autofosforila lo que resulta en la activación de los miembros aguas abajo de la vía MAPK. La presencia de TrkA conduce a la diferenciación celular y puede desempeñar un papel en la especificación de los subtipos de neuronas sensoriales. Por lo tanto las mutaciones en este gen también se han asociado a la insensibilidad congénita al dolor [39, 40, 41]. Es conocido que TrkA se asocia con TrpV1 y esta interacción es esencial para la potenciación mediada por NGF de la actividad de TrpV1 [42].

Los agentes conocidos con propiedades antagonistas incluyen el inhibidor de dominio quinasa K252A.

#### 40 TRPV1

El receptor de potencial transitorio vaniloide 1, TrpV1 (ID de Proteína de Suiza No. Q8NER1), también conocido como receptor vaniloide o el receptor de capsaicina, es un canal catiónico regulado por ligandos no selectivo que puede ser activado por una amplia variedad de estímulos f exógenos y endógenos, incluyendo calor superior a 43°C, bajo pH, anandamida, anandamida, N-araquidonoil-dopamina y capsaicina. Los receptores TRPV1 se encuentran altamente expresados en un subconjunto de neuronas de ganglios radicales posteriores, muestran una sensibilidad mucho más alta al calor que la mayoría de los canales iónicos y están involucrados en la transmisión y modulación de dolor, así como la integración de los diversos estímulos dolorosos [43,44]

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

#### 50 Compendio de la invención

La descripción se refiere al uso de al menos un agente capaz de unirse a una entidad del:

- a. complejo binario del receptor de dominio Vps10p : receptor Trpv, y/o
- b. complejo ternario del receptor de dominio Vps10p : TrkA : receptor Trpv complejo ternario inhibiendo así la formación de dicho complejo, para la preparación de un medicamento para el tratamiento del dolor en un mamífero.

En otro aspecto principal, la descripción se refiere al uso de al menos un agente capaz de inhibir la formación del:

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

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

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

10 En aun otro aspecto principal, la descripción se refiere a un procedimiento de tratamiento del dolor, comprendiendo dicho procedimiento administrar a un mamífero que lo necesite, al menos un agente capaz de inhibir la formación del:

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

15 En otro aspecto la descripción se refiere a un procedimiento *in vitro* para detectar el agente candidato o agente candidato, tal como se definió en la presente memoria más arriba que comprende las etapas de:

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

En otro aspecto la descripción se refiere a un procedimiento para determinar el grado de inhibición del agente o agente candidato tal como se definió en la presente memoria más arriba, sobre la actividad de un receptor de dominio Vps10p en un cultivo celular que expresa dicho receptor, en el que dicho receptor de dominio Vps10p comprende una secuencia de aminoácidos que tienen al menos 60% de identidad de secuencia respecto de SEC ID

NO. 1, SEC ID NO. 2, SEC ID NO. 3, SEC ID NO. 4 o SEC ID NO. 5, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:

- a. proporcionar un cultivo celular que expresa un receptor de dominio Vps10p, y
- b. proporcionar un agonista del receptor de dominio Vps10p, y
- 5 c. proporcionar una biblioteca de agentes potenciales, y
- d. proporcionar un ensayo para la determinación de la unión a, internalización de y señalización a través de, un receptor de dominio Vps10p, comprendiendo dicho ensayo
- e. añadir la biblioteca de agentes potenciales que deben ser ensayados c) al cultivo celular a), en presencia del agonista b), y
- 10 f. determinar
  - i. la cantidad de agente unido al receptor de dominio Vps10p, y/o
  - ii. la cantidad de agente internalizado por el receptor de dominio Vps10p, y/o
  - iii. el grado de señalización a través del receptor de dominio Vps10p, y
- 15 g. comparar la cantidad determinada en la etapa f) con una cantidad medida en ausencia de los agentes que deben ser ensayados,
- h. en el que la diferencia en las dos cantidades identifica un agente
  - i. capaz de la unión a un receptor de dominio Vps10p, y/o
  - ii. capaz de inhibir la señalización a través de un receptor de dominio Vps10p, y/o
  - iii. capaz de inhibir la internalización de un agonista de dicho receptor de dominio Vps10p.
- 20 En aun otro aspecto la descripción se refiere a un procedimiento para determinar el grado de inhibición del agente o agente candidato tal como se definió en la presente memoria más arriba, sobre la actividad de un receptor TrpV en un cultivo celular que expresa dicho receptor, en el que dicho receptor TrpV comprende una secuencia de aminoácidos que tienen al menos 70% de identidad de secuencia respecto de SEC ID NO. 6, SEC ID NO. 7, SEC ID NO. 8 o SEC ID NO. 9, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:
- 25 a. proporcionar un cultivo celular que expresa un receptor Trpv, y
- b. proporcionar un agonista del receptor Trpv, y
- c. proporcionar una biblioteca de agentes potenciales, y
- d. proporcionar un ensayo para la determinación de la unión a un receptor Trpv, comprendiendo dicho ensayo
- 30 e. añadir la biblioteca de agentes potenciales que deben ser ensayados c) al cultivo celular a), en presencia del agonista b), y
- f. determinar la cantidad de agente unido al receptor Trpv y
- g. comparar la cantidad determinada en la etapa f) con una cantidad medida en ausencia del agente que debe ser ensayado,
- h. en el que la diferencia en las dos cantidades identifica un agente capaz de unirse a un receptor Trpv.
- 35 En otro aspecto la descripción se refiere a un procedimiento para determinar el grado de inhibición de un agente o un agente candidato como se define en la presente memoria más arriba sobre la actividad de un receptor TrkA en un cultivo celular que expresa dicho receptor, en el que dicho receptor TrkA comprende una secuencia de aminoácidos que tienen al menos 70% de identidad de secuencia respecto de SEC ID NO. 10, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:
- 40 a. proporcionar un cultivo celular que expresa un receptor TrkA, y
- b. proporcionar un agonista del receptor TrkA, y
- c. proporcionar una biblioteca de agentes potenciales, y
- d. proporcionar un ensayo para la determinación de la unión a un receptor TrkA, comprendiendo dicho ensayo

e. añadir la biblioteca de agentes potenciales que deben ser ensayados c) al cultivo celular a), en presencia del agonista b), y

f. determinar la cantidad de agente unido al receptor TrkA y

5 g. comparar la cantidad determinada en la etapa f) con una cantidad medida en ausencia del agente que debe ser ensayado, en el que la diferencia en las dos cantidades identifica un agente capaz de unirse a un receptor TrkA.

En un aspecto adicional la descripción se refiere a un procedimiento para determinar el grado de inhibición de un agente o agente candidato como se define en la presente memoria más arriba sobre la actividad de un receptor de dominio Vps10p en un cultivo celular que expresa dicho receptor y con un cultivo celular que carece de la expresión de dicho receptor, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:

10 a. proporcionar un cultivo celular que expresa un receptor de dominio Vps10p, y

b. proporcionar un cultivo celular que no expresa un receptor de dominio Vps10p, y

c. opcionalmente proporcionar un cultivo celular que sobreexpresa un receptor de dominio Vps10p

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

e. proporcionar una biblioteca de agentes potenciales, y

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

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

h. determinar

i. la cantidad de agente unido al receptor de dominio Vps10p, y/o

20 ii. la cantidad de agente internalizado por el receptor de dominio Vps10p, y/o

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

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

j. en el que la diferencia en las cantidades identifica un agente capaz de

25 i. unirse a un receptor de dominio Vps10p, y/o

ii. inhibir la señalización a través de un receptor de dominio Vps10p, y/o

iii. inhibir la internalización de un agonista de dicho receptor de dominio Vps10p.

En aun otro aspecto la descripción se refiere a un procedimiento para determinar el grado de inhibición de un agente o un agente candidato como se define en la presente memoria más arriba sobre la actividad de un receptor Trpv en un cultivo celular que expresa dicho receptor y con un cultivo celular que carece de la expresión de dicho receptor, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:

a. proporcionar un cultivo celular que expresa un receptor Trpv, y

b. proporcionar un cultivo celular que no expresa un receptor Trpv, y

c. opcionalmente proporcionar un cultivo celular que sobreexpresa a trpV receptor

35 d. proporcionar un agonista del receptor Trpv, y

e. proporcionar una biblioteca de agentes potenciales, y

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

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

40 i. la cantidad de agente unido al receptor Trpv, y/o

ii. el grado de señalización a través del receptor Trpv, y

- h. comparar la cantidad de agente determinada en la etapa h) utilizando a) con la cantidad determinada en h) utilizando b) y la cantidad determinada en g) utilizando c),
- i. en el que la diferencia en las cantidades identifica un agente capaz de unirse a un receptor Trpv, y/o inhibir la señalización a través de TrpV.
- 5 En un aspecto adicional la descripción se refiere a un procedimiento para determinar el grado de inhibición de un agente o agente candidato, sobre la actividad de un receptor TrkA en un cultivo celular que expresa dicho receptor y con un cultivo celular que carece de la expresión de dicho receptor, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:
- a. proporcionar un cultivo celular que expresa un receptor TrkA, y
- 10 b. proporcionar un cultivo celular que no expresa un receptor TrkA, y
- c. opcionalmente proporcionar un cultivo celular que sobreexpresa un receptor TrkA
- d. proporcionar un agonista del receptor TrkA, y
- e. proporcionar una biblioteca de agentes potenciales, y
- f. proporcionar un primer ensayo que comprende a) y un segundo ensayo que comprende b) y opcionalmente un
- 15 tercer ensayo que comprende c), y
- g. añadir la biblioteca de agentes potenciales que deben ser ensayados a los tres ensayos, y
- h. determinar
- i. la cantidad de agente unido al receptor TrkA, y/o
- ii. la cantidad de agente internalizado por el receptor TrkA, y/o
- 20 iii. el grado de señalización a través del receptor TrkA, y
- i. comparar la cantidad de agente determinada en la etapa h) utilizando a) con la cantidad determinada en h) utilizando b) y opcionalmente la cantidad determinada en g) utilizando c),
- j. en el que la diferencia en las cantidades identifica un agente capaz de unirse a un receptor TrkA, y/o inhibir la señalización a través de TrkA.
- 25 En aun otro aspecto la descripción se refiere a un procedimiento para determinar el grado de inhibición de un agente o agente candidato, sobre la actividad de un receptor de dominio Vps10p en un mamífero que expresa dicho receptor con un segundo mamífero que carece de la expresión de dicho receptor y un tercer mamífero que sobreexpresa dicho receptor, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:
- a. proporcionar a un mamífero que expresa un receptor de dominio Vps10p, y
- 30 b. proporcionar a un mamífero que no expresa un receptor de dominio Vps10p, y
- c. proporcionar a un mamífero que sobreexpresa un receptor de dominio Vps10p, y
- d. proporcionar un agonista para la sensación de dolor del receptor de dominio Vps10p, y
- e. proporcionar una biblioteca de agentes potenciales, y
- f. administrar dicha biblioteca de agentes a dicho mamífero de a), b) y c) respectivamente, y
- 35 g. determinar el grado de señalización de dolor a través del receptor de dominio Vps10p, en cada uno de los mamíferos definidos en a), b) y c), utilizando
- i. ensayo de von Frey y/o
- ii. ensayo de inmersión de cola y/o
- iii. ensayo de placa caliente, y
- 40 h. comparar el grado de señalización de dolor en la etapa g) utilizando a) con el grado determinado en g) utilizando b) con el grado determinado en g) utilizando c),
- en el que la diferencia en el grado de inhibición identifica un agente capaz de unirse a un receptor de dominio Vps10p, inhibiendo la señalización a través de un receptor de dominio Vps10p.

En aun otro aspecto la descripción se refiere a un procedimiento para determinar el grado de inhibición de un agente o agente candidato como se define en la presente memoria más arriba sobre la actividad de un receptor Trpv en un mamífero que expresa dicho receptor con un segundo mamífero que carece de la expresión de dicho receptor y un tercer mamífero que sobreexpresa dicho receptor, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:

- 5a. proporcionar a un mamífero que expresa un receptor Trpv, y
  - b. proporcionar a un mamífero que no expresa un receptor Trpv, y
  - c. proporcionar a un mamífero que sobreexpresa un receptor Trpv, y
  - d. proporcionar un agonista para la sensación de dolor of el receptor Trpv, y
  - e. proporcionar una biblioteca de agentes potenciales, y
  - 10f. administrar dicha biblioteca de agentes a dicho mamífero de a), b) y c) respectivamente, y
  - g. determinar el grado de señalización de dolor a través del receptor Trpv, en cada uno de los mamíferos definidos en a), b) y c), utilizando ensayo de von Frey y/o Ensayo de inmersión de cola y/o Ensayo de placa caliente, y
  - h. comparar el grado de señalización de dolor en la etapa g) utilizando a) con el grado determinado en g) utilizando b) con el grado determinado en g) utilizando c),
- 15 en el que la diferencia en el grado de inhibición identifica un agente capaz de unirse a un receptor Trpv e inhibir la señalización a través de dicho receptor Trpv.
- En otro aspecto la descripción se refiere a un procedimiento para determinar el grado de inhibición de un agente o agente candidato como se define en la presente memoria más arriba, sobre la actividad de un complejo binario de receptor de dominio Vps10p : receptor Trpv en un mamífero que expresa dichos receptores con un segundo mamífero que carece de la expresión de dichos receptores y un tercer mamífero que sobreexpresa dichos receptores, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:
- a. proporcionar a un primer y un segundo mamífero que expresan tanto un receptor Trpv y un receptor de dominio Vps10p, y
  - 25 b. proporcionar a un primer y un segundo mamífero que carecen de la expresión de un receptor Trpv y un receptor de dominio Vps10p, y
  - c. proporcionar a un primer y un segundo mamífero que sobreexpresan un receptor Trpv y un receptor de dominio Vps10p, y
  - d. proporcionar un agonista para la sensación de dolor del receptor Trpv y/o receptor de dominio Vps10p, y
  - 30 e. proporcionar una biblioteca de agentes potenciales capaces de inhibir la señalización a través de un complejo binario del receptor de dominio Vps10p : receptor Trpv, y
  - f. administrar dicha biblioteca de agentes a dicho primer mamífero de a), b) y c) respectivamente, y
  - g. administrar placebo a dicho segundo mamífero de a), b), y c), y
  - h. determinar el grado de señalización de dolor a través del receptor Trpv, en cada uno del primer y segundo mamíferos definidos en a), b) y c), utilizando
- 35 i. ensayo de von Frey y/o
- ii. ensayo de inmersión de cola y/o
- iii. ensayo de placa caliente, y
- i. comparar el grado de señalización de dolor en el primer y segundo mamíferos de la etapa h) utilizando a) y
  - 40 j. comparar el grado de señalización de dolor en el primer y segundo mamíferos de h) utilizando b) y comparando el grado de señalización de dolor en el primer y segundo mamíferos de h) utilizando c),
- en el que la diferencia en el grado de inhibición de señalización de dolor identifica un agente capaz de unirse a un complejo de receptor de dominio Vps10p: receptor Trpv e inhibiendo la señalización a través de dicho complejo.
- En un aspecto importante la descripción se refiere a un ratón transgénico knock-out en el que los genes endógenos del receptor de dominio Vps10p SorCS1 y/o SorCS2 se han interrumpido para abolir la expresión de un receptor
- 45

funcional, y en el que dicho ratón exhibe una respuesta reducida a los estímulos de dolor en relación con un ratón de control no transgénico.

En un aspecto la descripción se refiere a un procedimiento para detectar un agente candidato para la habilidad de reducir el dolor en el ratón SorCS1-2 transgénico como se define en la presente memoria más arriba que comprende las etapas de:

- a. proporcionar un ratón SorCS1-2 como se define en la presente memoria más arriba;
- b. proporcionar un ratón de tipo salvaje que carece de la interrupción génica en SorCS1-2 como se define en la presente memoria más arriba; y
- c. proporcionar un ratón de tipo salvaje de control que carece de la interrupción génica en SorCS1-2 como se define en la presente memoria más arriba; y
- d. administrar a dicho primer ratón de tipo salvaje (b) un agente candidato, y comparar el comportamiento de dolor de dicho ratón transgénico de la etapa (a) con el comportamiento de dolor de dicho ratón de tipo salvaje de la etapa (b) al que se le administró dicho agente candidato con el comportamiento de dolor de dicho control ratón de tipo salvaje de la etapa (c) al que no se le administró dicho agente candidato; en el que una reducción en el comportamiento de dolor en dicho ratón de tipo salvaje (b) al que se le administró dicho agente candidato hasta un nivel comparable con dicho segundo ratón transgénico al que no se le administró dicho agente candidato relativamente respecto del ratón de tipo salvaje de control (c) indica que el agente candidato reduce el comportamiento del dolor.

En otro aspecto principal la descripción se refiere a un ratón transgénico para la sobreexpresión condicional u obligada de Sortilina o SorCS1 o SorCS2 en tejidos neuronales.

En un aspecto la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un agente como se definió en la presente memoria más arriba, habiéndose determinado la actividad de dicho agente como se definió por los procedimientos de detección en la presente memoria más arriba.

En un aspecto, la invención se refiere a un procedimiento de tratamiento del dolor en un sujeto que comprende administrar a un individuo que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición farmacéutica como se definió en la presente memoria más arriba.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un procedimiento para tratar la neuropatía administrando a un individuo que lo necesite una cantidad suficiente del agente como se define en la presente memoria.

En un aspecto, la descripción se refiere a un kit en partes que comprende:

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

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

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

En un aspecto, la descripción se refiere a un procedimiento para la comercialización de un medicamento, comprendiendo dicho producto al menos un agente aislado, siendo dicho agente como se define en la presente memoria más arriba, y comprendiendo dicha comercialización la difusión pública de la información de que la inhibición de la formación de dicho complejo tiene impacto sobre la sensación de dolor en dicho sujeto.

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

Figura 1: perspectiva general del receptor

Figura 2: interacciones físicas de los receptores - coinmunoprecipitaciones.

Figura 3: Interacciones físicas de los receptores – esquemática

Figura 4: Datos estereológicos e inmunofluorescencia de DRG

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

Figura 5c: ensayo de von Frey

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

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

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

### Descripción detallada de la invención

#### 5 Definiciones

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

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

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

- 20 Un ligando que puede unirse a un receptor, alterar la función del receptor y desencadenar una respuesta fisiológica se llama un agonista para ese receptor. Unión a un receptor agonista puede caracterizarse tanto en términos de cuánto se puede activar la respuesta fisiológica y en términos de la concentración del agonista que se requiere para producir la respuesta fisiológica. La unión de alta afinidad al ligando implica que una concentración relativamente baja de un ligando es adecuada para ocupar al máximo un sitio de unión a ligando y desencadenar una respuesta fisiológica. Unión de baja afinidad implica que se requiere una concentración relativamente alta de un ligando antes de que el sitio de unión está ocupado máximo y se consigue la máxima respuesta fisiológica al ligando. La unión del 25 ligando a menudo se caracteriza en términos de la concentración de ligando a la que la mitad de los sitios de unión a receptores están ocupados, conocida como la constante de disociación ( $K_d$ ). La afinidad también es la resistencia de la unión entre los receptores y sus ligandos, por ejemplo entre un anticuerpo y su antígeno.

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

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

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

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

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

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

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

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

- 50 Antagonista : Un antagonista es en este caso sinónimo de un inhibidor. Un antagonista es un compuesto capaz de disminuir la actividad de un efector tal como un receptor. En concreto, un antagonista de un receptor de dominio Vps10p es un compuesto capaz de unirse a uno o más de estos sitios de unión del receptor de dominio Vps10p inhibiendo de ese modo la unión de otro ligando de este modo inhibiendo una respuesta fisiológica. Análogamente,

los antagonistas TRPV y TrkA son compuestos capaces de unirse a uno o más de estos sitios de unión de los receptores Trpv y TrkAs inhibiendo de ese modo la respuesta fisiológica del compuesto ligando agonista.

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

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

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

- 10 "Un anticuerpo completo" se refiere a una glicoproteína que comprende al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas livianas (L) interconectadas por enlaces disulfuro, o una porción de unión al antígeno del mismo. Cada cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada (abreviada en la presente memoria como V<sub>H</sub>) y una región constante de cadena pesada (abreviada en presente la memoria como C<sub>H</sub>). Cada cadena liviana está compuesta por una región variable de cadena liviana (abreviada en la presente memoria como V<sub>L</sub>) y una región constante de cadena liviana (abreviada en la presente memoria como C<sub>L</sub>). Las regiones V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> pueden ser subdivididas en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones de determinación de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco (FR). Cada V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> está compuesta de tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el extremo terminal amino al extremo terminal carboxi en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las regiones variables de las cadenas livianas y pesadas contienen un dominio de unión que interacciona con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar la unión de la inmunoglobulina en tejidos o factores del huésped, incluyendo varias células del sistema inmune (por ejemplo, células efectoras) y el componente de imprimería (C1q) del sistema clásico del complemento.

- 25 El término "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo, como se emplea en la presente memoria, se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que retienen la capacidad de unirse específicamente a un anticuerpo antígeno. Se ha demostrado que la función de unión a antígeno de un anticuerpo puede ser realizada por fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Los ejemplos de fragmentos de unión contemplados dentro de la expresión "porción de unión al antígeno" de un anticuerpo incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios V<sub>L</sub>, V<sub>H</sub>, C<sub>L</sub> y C<sub>H1</sub>; (ii) un fragmento F(ab')<sub>2</sub>, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste en los dominios V<sub>H</sub> y C<sub>H1</sub>; (iv) un fragmento Fv que consiste en los dominios V<sub>L</sub> y V<sub>H</sub> de un único brazo de un anticuerpo, (v) un fragmento dAb (Ward *et al.*, (1989) *Nature* 341:544-546), que consiste en un dominio V<sub>H</sub>; (vi) una región de determinación de complementariedad aislada (CDR ), y (vii) una combinación de dos o más CDR aisladas que pueden opcionalmente estar unidas por un acoplador sintético. Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, V<sub>L</sub> y V<sub>H</sub>, están codificados por genes separados, pueden unirse, utilizando procedimientos recombinantes, por un acoplador sintético que les permite ser como una cadena de proteína simple en la que el par de regiones V<sub>L</sub> y V<sub>H</sub> para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv de cadena simple (scFv) ; véase, por ejemplo, Bird *et al.* (1988) *Science* 242:423-426; y Huston *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883). Dichos anticuerpos de cadena simple también están destinados a estar comprendidos dentro de la expresión "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo.

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

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

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

- 55 El término "epítipo discontinuo" como se emplea en la presente memoria, significa un epítipo conformacional de un antígeno proteico que está formado de al menos dos regiones separadas en la secuencia primaria de la proteína. Un epítipo discontinuo también puede estar formado por al menos dos regiones de una o más proteínas, en tal caso, el antígeno puede estar formado por una o más proteínas .

El término "molécula biespecífica" pretende incluir cualquier agente, por ejemplo, una proteína, péptido, o proteína o

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

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

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

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

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

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

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

Como se emplea en la presente memoria, "unión específica" se refiere a la unión del anticuerpo a un antígeno predeterminado. Típicamente, el anticuerpo se une con una afinidad correspondiente a un  $K_D$  de aproximadamente  $10^{-7}$  M o menos, tal como aproximadamente  $10^{-8}$  M o menos, tal como aproximadamente  $10^{-9}$  M o menos, aproximadamente  $10^{-10}$  M o menos, o aproximadamente  $10^{-11}$  M o incluso menos, cuando se mide como afinidades aparentes en base a los valores de  $IC_{50}$  en FACS, y se une al antígeno predeterminado con una afinidad correspondiente a un  $K_D$  que es al menos diez veces menor, tal como al menos 100 veces inferior a su afinidad para unirse a un antígeno no específico (por ejemplo, BSA, caseína) distinto del antígeno predeterminado o un antígeno

estrechamente relacionado.

Avidez: La fuerza de combinación funcional de un anticuerpo con su antígeno que está relacionada tanto con la afinidad de la reacción entre los epítomos y paratopos, y las valencias del anticuerpo y antígeno.

Clases de anticuerpos: Dependiendo de las secuencias de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas, las inmunoglobulinas pueden asignarse a diferentes clases. Hay al menos cinco (5) clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de estas pueden dividirse además en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG-1, IgG-2, IgG-3 y de IgG-4; IgA-1 e IgA-2. Los dominios constantes de cadenas pesadas que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan alfa ( $\alpha$ ), delta ( $\delta$ ), épsilon ( $\epsilon$ ), gamma ( $\gamma$ ) y mu ( $\mu$ ), respectivamente. Las cadenas livianas de anticuerpos pueden ser asignadas a uno de dos tipos claramente distintos, denominados kappa ( $\kappa$ ) y lambda ( $\lambda$ ), en base a las secuencias amino de su dominio constante. Las estructuras de las subunidades y las configuraciones tridimensionales de diferentes clases de inmunoglobulinas son bien conocidas.

Sitio de combinación de anticuerpos: Un sitio de combinación de anticuerpos es aquella porción estructural de una molécula de anticuerpo compuesta por regiones hipervariables y variables de cadena liviana y pesada y que se une específicamente a (inmunorreacciona con) un antígeno. El término inmunorreacciona en sus diversas formas significa la unión específica entre una molécula que contiene un determinante antigénico y una molécula que contiene un sitio de combinación de anticuerpos tal como una molécula de anticuerpo completa o una parte de la misma. Como alternativa, un sitio de combinación de anticuerpos se conoce como un sitio de unión de antígenos.

Anticuerpo quimérico: Un anticuerpo en el que las regiones variables son de una especie animal y las regiones constantes son de otra especie de animal. Por ejemplo un anticuerpo quimérico puede ser un anticuerpo que tiene regiones variables que se obtienen de anticuerpo monoclonal de ratón y regiones constantes que son humanas.

Región de determinación de complementariedad o CDR: Regiones, en los dominios V de un anti-cuerpo que en conjunto forman el dominio de unión y reconocimiento de anticuerpos.

Región constante o dominio constante o dominio C: las regiones constantes son aquellas porciones estructurales de una molécula de anticuerpo que comprende secuencias de residuos de aminoácidos dentro de un isotipo dado que puede contener sustituciones conservadoras en el mismo. Las regiones constantes de cadena pesada de inmunoglobulina ejemplares son aquellas porciones de una molécula de inmunoglobulina conocida en la técnica como CH1, CH2, CH3, CH4 y CH5. Una región constante de inmunoglobulina de cadena liviana es aquella parte de una molécula de inmunoglobulina conocida en la técnica como C<sub>L</sub>.

Diacuerpos: Este término se refiere a pequeños fragmentos de anticuerpos con dos sitios de unión a antígenos, dichos fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de cadena liviana (VL) en la misma cadena de polipéptidos (VH-VL). Utilizando un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, los dominios son forzados a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena y crear dos -sitios de la unión a antígenos. Los diacuerpos se describen más completamente en, por ejemplo, EP 404,097; WO 93/11161; y Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448 (1993).

Fv: fragmento de anticuerpo de cadena doble que contiene tanto un V<sub>H</sub> como un V<sub>L</sub>.

Marco de anticuerpo humano: Una molécula que tiene un sitio de unión a antígeno y esencialmente todas las partes derivadas de inmunoglobulina restantes de la molécula derivada de una inmunoglobulina humana.

Marco de anticuerpo humanizado: Una molécula que tiene un sitio de unión a antígeno obtenido de una inmunoglobulina de una especie no humana, mientras que algunas o todas las partes derivadas de inmunoglobulina restantes de la molécula se obtienen de una inmunoglobulina humana. El sitio de unión a antígenos puede comprender o bien un dominio de variable completo de la inmunoglobulina no humana fusionada en uno o más dominios constantes humanos; o una o más de las regiones de determinación de complementariedad (CDRs) injertadas en regiones marco humanas apropiadas en el dominio variable. En un anticuerpo humanizado, los CDRs pueden ser de un anticuerpo monoclonal de ratón y las otras regiones del anticuerpo son humanas.

Inmunoglobulina: Los anticuerpos en suero, incluyendo IgG, IgM, IgA, IgE y IgD.

Isotipos de Inmunoglobulina: nombres dados a Ig que tienen diferentes cadenas H, los nombres son IgG (IgG<sub>1, 2, 3, 4</sub>), IgM, IgA (IgA<sub>1, 2</sub>), sIgA, IgE, IgD.

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

Anticuerpo Monoclonal: la frase anticuerpo monoclonal en sus diversas formas gramaticales se refiere a una población de moléculas de anticuerpo que contiene sólo una especie de sitio de combinación de anticuerpos capaz

de inmunoreaccionar con un antígeno particular. Un anticuerpo monoclonal por lo tanto presenta típicamente una sola afinidad de unión para cualquier antígeno con el que inmunorreacciona. Un anticuerpo monoclonal puede contener una molécula de anticuerpo que tiene una pluralidad de sitios de combinación de anticuerpo, cada uno inmuno-específico para un antígeno diferente, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal biespecífico.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

- 50 Sitio de unión 2 de Sortilina: A sitio de unión de sortilina que tiene baja afinidad para neurotensina o un fragmento o variante de neurotensina, comprendiendo dicho sitio de unión los residuos de aminoácidos L572, L114, V112, R109 a S111, S115 a G118, T570, G571, W586, W597, T168-I174, L572, A573 y S584 a F588 de SEC ID NO. 1. Más preferentemente el sitio de unión de baja afinidad a sortilina de neurotensina comprende los aminoácidos L572, L114,

V112, R109 a S111, S115 a G118, T570, G571, W586 y W597 de SEC ID NO. 1. Mucho más preferentemente el sitio de unión de baja afinidad a sortilina de neurotensina comprende los aminoácidos L572, L114 y V112. El sitio de unión 2 es promiscuo y puede unirse al propéptido de Sortilina (residuos de aminoácidos 34-77 de SEC ID NO. 1).

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

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

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

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

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

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

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

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

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

50 Cicloalqueno: significa un radical carbocíclico insaturado monovalente que consiste en uno, dos o tres anillos, de tres a ocho carbonos por anillo, que puede opcionalmente estar sustituido con uno o dos sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en hidroxilo, ciano, alqueno inferior, alcoxi inferior, haloalcoxi inferior, alqueno inferior, halo, haloalqueno, hidroxialqueno, nitro, alcoxycarboneno, amino, alquenoilamino, alquenoilsulfonilo, arilsulfonilo, alquenoilaminosulfonilo, arilaminosulfonilo, alquilsulfonilamino, arilsulfonilamino, alquenoilaminocarbonilo, arilaminocarbonilo, alquenoilcarbonilamino y arilcarbonilamino.  
55

Cicloalquilo: significa un radical carbocíclico saturado monovalente que consiste en uno, dos o tres anillos, de tres a ocho carbonos por anillo, que puede opcionalmente estar sustituido con uno o dos sustituyentes seleccionados del

grupo que consiste en hidroxilo, ciano, alquilo inferior, alcoxi inferior, haloalcoxi inferior, alquiltio, halo, haloalquilo, hidroxialquilo, nitro, alcoxycarbonilo, amino, alquilamino, alquilsulfonilo, arilsulfonilo, alquilaminosulfonilo, arilaminosulfonilo, alquilsulfonilamino, arilsulfonilamino, alquilaminocarbonilo, arilaminocarbonilo, alquilcarbonilamino y arilcarbonilamino

- 5 Interacción dipolo-dipolo: El término "interacción dipolo-dipolo" como se emplea en la presente memoria se refiere a la atracción que puede ocurrir entre dos o más moléculas polares. Por lo tanto, "la interacción dipolo-dipolo" se refiere a la atracción del extremo positivo sin carga, parcial de una primera molécula polar respecto del extremo negativo sin carga, parcial de la segunda molécula polar. "La interacción dipolo-dipolo" también se refiere a la unión de hidrógeno intermolecular.
- 10 Interacción electrostática: El término "interacción electrostática" como se emplea en la presente memoria se refiere a cualquier interacción que ocurre entre componentes cargados, moléculas o iones, debido a las fuerzas de atracción cuando componentes de carga eléctrica opuesta se atraen entre sí. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a: interacciones iónicas, interacciones covalentes, interacciones entre un ion y un dipolo (molécula polar e ion), interacciones entre dos dipolos (cargas parciales de moléculas polares), enlaces de hidrógeno y enlaces de dispersión de London (dipolos inducidos de moléculas polarizables). Por lo tanto, por ejemplo, "interacción iónica" o "interacción electrostática" se refiere a la atracción entre una primera molécula con carga positiva y una segunda molécula con carga negativa. Las interacciones iónicas o electrostáticas incluyen, por ejemplo, la atracción de entre un agente bioactivo con carga negativa.

- Entidad: una entidad es unitaria. Específicamente una entidad del complejo binario del receptor de dominio Vps10p : receptor Trpv puede ser un receptor de dominio Vps10p seleccionado del grupo que consiste en Sortilina (SEC ID NO. 1), SorLA (SEC ID NO. 2), SorCS1 (SEC ID NO. 3), SorCS2 (SEC ID NO. 4) y SorCS3 (SEC ID NO. 5), y/o un receptor Trpv seleccionado del grupo que consiste en TrpV1 (SEC ID NO. 6), TrpV2 (SEC ID NO. 7), TrpV3 (SEC ID NO. 8) y TrpV4 (SEC ID NO. 9).

- 25 Por consiguiente una entidad del complejo ternario del receptor de dominio Vps10p : TrkA : receptor Trpv puede ser un receptor de dominio Vps10p seleccionado del grupo que consiste en Sortilina Sortilina (SEC ID NO. 1), SorLA (SEC ID NO. 2), SorCS1 (SEC ID NO. 3), SorCS2 (SEC ID NO. 4) y SorCS3 (SEC ID NO. 5), y/o un receptor Trpv seleccionado del grupo que consiste en TrpV1 (SEC ID NO. 6), TrpV2 (SEC ID NO. 7), TrpV3 (SEC ID NO. 8) y TrpV4 (SEC ID NO. 9), y/o un receptor TrkA (SEC ID NO. 10).

- 30 Fragmento Fab: El fragmento Fab de unión al antígeno del fragmento es una región en un anticuerpo que se une a antígenos. Se compone de un dominio constante y un dominio variable de cada una de las cadena pesada y cadena liviana. Estos dominios forman el paratopo - sitio de unión al antígeno - en el extremo terminal amino del monómero. Los dos dominios variables se unen al epitopo en sus antígenos específicos.

- 35 En un entorno experimental, los fragmentos Fc y Fab se pueden generar en el laboratorio. La enzima papaína se puede utilizar para escindir un monómero de inmunoglobulina en dos fragmentos Fab y un fragmento Fc. La enzima pepsina escinde la región bisagra inferior, por lo que se forma un fragmento F(ab')<sub>2</sub> y un fragmento Fc. Las regiones variables de las cadenas pesadas y liviana pueden estar condensados juntos para formar un fragmento variable de cadena simple (scFv), que es sólo la mitad del tamaño del fragmento Fab sin embargo, conserva la especificidad original de la inmunoglobulina progenitora.

- 40 Formar un anillo: significa que los átomos mencionados están conectados a través de un enlace cuando se forma la estructura de anillo.

- 45 Fragmentos: Los fragmentos de polipéptido de acuerdo a la descripción, incluyendo cualquier equivalente funcional del mismo, pueden en una realización comprender menos que 500 residuos de aminoácidos, tal como menos que 450 residuos de aminoácidos, por ejemplo menos que 400 residuos de aminoácidos, tal como menos que 350 residuos de aminoácidos, por ejemplo menos que 300 residuos de aminoácidos, por ejemplo menos que 250 residuos de aminoácidos, tal como menos que 240 residuos de aminoácidos, por ejemplo menos que 225 residuos de aminoácidos, tal como menos que 200 residuos de aminoácidos, por ejemplo menos que 180 residuos de aminoácidos, tal como menos que 160 residuos de aminoácidos, por ejemplo menos que 150 residuos de aminoácidos, tal como menos que 140 residuos de aminoácidos, por ejemplo menos que 130 residuos de aminoácidos, tal como menos que 120 residuos de aminoácidos, por ejemplo menos que 110 residuos de aminoácidos, tal como menos que 100 residuos de aminoácidos, por ejemplo menos que 90 residuos de aminoácidos, tal como menos que 85 residuos de aminoácidos, por ejemplo menos que 80 residuos de aminoácidos, tal como menos que 75 residuos de aminoácidos, por ejemplo menos que 70 residuos de aminoácidos, tal como menos que 65 residuos de aminoácidos, por ejemplo menos que 60 residuos de aminoácidos, tal como menos que 55 residuos de aminoácidos, por ejemplo menos que 50 residuos de aminoácidos. Los fragmentos de neurotensina incluyen pero no se limitan a los aminoácidos del terminal C de neurotensina PYIL y YIL.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Fragmentos que comparten homología con fragmentos de SEC ID NO.: 1 a 13, respectivamente, han de considerarse como que caen dentro del alcance de la descripción cuando son preferentemente al menos 60 por ciento homólogos, por ejemplo al menos 65 por ciento homólogos, por ejemplo al menos 70 por ciento homólogos, por ejemplo al menos 75 por ciento homólogos, por ejemplo al menos 80 por ciento homólogos, por ejemplo al menos 85 por ciento homólogos, por ejemplo al menos 90 por ciento homólogos, por ejemplo al menos 92 por ciento homólogos, tal como al menos 94 por ciento homólogos, por ejemplo al menos 95 por ciento homólogos, tal como al menos 96 por ciento homólogos, por ejemplo al menos 97 por ciento homólogos, tal como al menos 98 por ciento homólogos, por ejemplo al menos 99 por ciento homólogos con dichas secuencias de fragmentos predeterminadas, respectivamente. De acuerdo a una realización de la invención, los porcentajes de homología se refieren a porcentajes de identidad.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

- Además de los compuestos peptídicos descritos en este documento, se pueden formular compuestos estéricamente similares para imitar las partes clave de la estructura peptídica y que tales compuestos también se pueden usar de la misma manera que los péptidos de la invención. Esto se puede conseguir mediante técnicas de modelado y diseño químico conocidas por los expertos en la técnica. Por ejemplo, la esterificación y otras alquilaciones pueden ser empleadas para modificar el extremo terminal amino de, por ejemplo, un esqueleto peptídico di-arginina, para imitar una estructura tetra peptídica. Se entenderá que todas estas construcciones estéricamente similares caen dentro del alcance de la descripción.

Los péptidos con alquilaciones del extremo terminal N y esterificaciones del extremo terminal C también están contemplados dentro de la descripción. Los equivalentes funcionales comprenden también conjugados agregados o

covalentes y glicosilados formados con los mismos u otros fragmentos moduladores de la actividad de la proneurotrofina y/o moléculas moduladoras de la actividad de la proneurotrofina, incluyendo dímeros o restos químicos no relacionados. Tales equivalentes funcionales se preparan mediante unión de funcionalidades a grupos que se encuentran en el fragmento incluyendo en uno cualquiera o ambos de los extremos terminales N y C por procedimientos conocidos en la técnica.

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

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

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

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

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

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

Los antagonistas de los receptores de dominio Vpas10p incluyendo pero sin limitarse a Sortilina que inhiben los fragmentos de péptidos se pueden sintetizar in vitro e in vivo. También se describen en la técnica anterior procedimientos para la síntesis in vitro son bien conocidos, siendo los procedimientos apropiados o convenientemente adaptables a la síntesis in vivo de inhibidores de sortilina. Cuando se sintetiza in vivo, una célula huésped se transforma con vectores que contienen ADN que codifica un inhibidor peptídico de sortilina o un fragmento del mismo. Un vector se define como una construcción de ácido nucleico replicable. Los vectores se usan para mediar la expresión del modulador de la actividad de proneurotrofinas. Un vector de expresión es una construcción de ADN replicable en la que una secuencia de ácidos nucleicos que codifica el fragmento de inhibidor de sortilina predeterminado, o cualquier equivalente funcional del mismo que se puede expresar in vivo, está unido operativamente a secuencias de control adecuadas capaces efectuar la expresión del fragmento o equivalente en un huésped adecuado. Tales secuencias de control son bien conocidos en la técnica. Tanto las células eucariotas como las procaríotas pueden usarse para la síntesis de ligandos. Los cultivos de células derivadas de organismos multicelulares sin embargo representan células huésped preferentes. En principio, cualquier cultivo de células eucariotas superiores es factible, ya sea cultivo de vertebrados o de invertebrados. Los ejemplos de útiles líneas de células huésped son células VERO y HeLa, líneas celulares de ovario de hámster chino (CHO), y WI38, BHK, COS-7,

293 y líneas celulares MDCK. Las células huésped preferentes son células eucariotas conocidas para sintetizar inhibidores de sortilina endógenos. Los cultivos de tales células huésped pueden ser aislados y utilizados como fuente del fragmento, o se utilizan en los procedimientos terapéuticos de tratamiento, incluidos los procedimientos terapéuticos destinados a promover o inhibir un estado de crecimiento, o procedimientos de diagnóstico realizados en el cuerpo humano o animal.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Polipéptido: El término "polipéptido" como se emplea en la presente memoria se refiere a una molécula que

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

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

- i) un polinucleótido que comprende una secuencia de codificación predeterminada, o
  - ii) un polinucleótido que codifica una secuencia de aminoácidos predeterminada, o
  - iii) un polinucleótido que codifica un fragmento de un polipéptido codificado por polinucleótidos (i) o (ii), en el que dicho fragmento tiene al menos una actividad predeterminada como se especifica en la presente memoria; y
  - iv) un polinucleótido cuya hebra complementaria se hibridiza en condiciones rigurosas con un polinucleótido como se define en uno cualquiera de los puntos (i), (ii) y (iii), y codifica un polipéptido, o un fragmento del mismo, que tiene al menos una actividad predeterminada como se especifica en la presente memoria; y
  - v) un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que se degenera convirtiéndose en la secuencia de nucleótidos de los polinucleótidos (iii) o (iv);
- o la hebra complementaria de dicho polinucleótido.

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

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

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

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

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

Debido a que dos polinucleótidos pueden cada uno (1) comprender una secuencia (es decir, una porción de la secuencia de polinucleótidos completa) que es similar entre los dos polinucleótidos, y (2) comprender además una secuencia que es divergente entre los dos polinucleótidos, las comparaciones de secuencias entre dos (o más) polinucleótidos se realiza típicamente comparando las secuencias de los dos polinucleótidos sobre una "ventana de comparación" para identificar y comparar regiones locales de similitud de secuencia. Una "ventana de comparación", como se emplea en la presente memoria, se refiere a un segmento conceptual de al menos 20 posiciones de nucleótidos contiguos en el que una secuencia de polinucleótidos puede compararse con una secuencia predeterminada de al menos 20 nucleótidos contiguos y en el que la parte de la secuencia de polinucleótidos en la ventana de comparación puede comprender adiciones o deleciones (es decir, espacios) de 20 por ciento o menos en

comparación con la secuencia predeterminada (que no comprende adiciones o deleciones) para el alineamiento óptimo de las dos secuencias.

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

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

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

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

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

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

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

- i) Aminoácidos que tienen cadenas laterales polares (Asp, Glu, Lys, Arg, His, Asn, Gln, Ser, Thr, Tyr, y Cys.)
- ii) Aminoácidos que tienen cadenas laterales no polares (Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Phe, Trp, Pro, y Met)

- iii) Aminoácidos que tienen cadenas laterales alifáticas (Gly, Ala Val, Leu, Ile)
- iv) Aminoácidos que tienen cadenas laterales cíclicas (Phe, Tyr, Trp, His, Pro)
- v) Aminoácidos que tienen cadenas laterales aromáticas (Phe, Tyr, Trp)
- vi) Aminoácidos que tienen cadenas laterales ácidas (Asp, Glu)
- 5 vii) Aminoácidos que tienen cadenas laterales básicas (Lys, Arg, His)
- viii) Aminoácidos que tienen cadenas laterales amida (Asn, Gln)
- ix) Aminoácidos que tienen cadenas laterales hidroxí (Ser, Thr)
- x) Aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen azufre (Cys, Met),
- xi) Aminoácidos débilmente hidrofóbicos neutrales (Pro, Ala, Gly, Ser, Thr)
- 10 xii) Aminoácidos ácidos hidrofílicos (Gln, Asn, Glu, Asp), y
- xiii) Aminoácidos hidrofóbicos (Leu, Ile, Val)

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

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

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

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

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

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

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

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

Dolor

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

Por consiguiente, en una realización de la presente invención el dolor es dolor crónico.

En otra realización de la presente invención el dolor es dolor neuropático.

En otra realización de la presente invención el dolor crónico es dolor neuropático.

En otra realización de la presente invención el dolor agudo es dolor neuropático.

- 5 En otra realización de la presente invención el dolor neuropático se selecciona del grupo que consiste en dolor neuropático periférico, dolor neuropático central y dolor neuropático mixto.

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

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

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

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

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

El complejo de receptores diana

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

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

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

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

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

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

- 25 Agente analgésico

En un aspecto principal la descripción se refiere al uso de al menos un agente (antagonista, compuesto, inhibidor o su sinónimo) capaz de unirse a un receptor (una entidad) del complejo binario del receptor de dominio Vps10p : receptor Trpv, y/o complejo ternario del receptor de dominio Vps10p : TrkA : receptor Trpv inhibiendo de ese modo la actividad transductora de dolor de dicho complejo, en la fabricación de un medicamento, para el tratamiento y/o

- 30 prevención de dolor, incluyendo pero sin limitarse a dolor agudo, dolor neuropático y dolor crónico, en un animal.

La invención en un aspecto principal adicional se refiere al uso de al menos un agente capaz de unirse a una entidad del:

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

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

La invención también se refiere al uso de al menos un agente capaz de inhibir la formación del:

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

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

La descripción en un aspecto se refiere a al menos un agente capaz de inhibir la formación del:

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

b. complejo ternario del receptor de dominio Vps10p : TrkA : receptor Trpv,

para su uso en un procedimiento para el tratamiento de dolor en un mamífero.

5 En una realización de la descripción el al menos un agente como se debate en la presente memoria más arriba es seleccionado de proteínas, péptidos, polipéptidos, anticuerpos, ARN antisentido, ADN antisentido, moléculas orgánicas pequeñas, ARNsi, receptores solubles de dominio Vps10p y fragmentos y variantes del mismo, receptores solubles Trpv y fragmentos y variantes del mismo y receptores soluble TrkAs y fragmentos y variantes del mismo.

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

En una realización el mamífero al que se le administran agentes de la descripción, es un conejo.

#### *Epítipo de unión*

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

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

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

En otra realización el al menos un agente de la descripción se une a al menos un residuo de aminoácido del sitio de unión que comprende los residuos de aminoácidos L572, L114, V112, R109 a S111, S115 a G118, T570, G571, W586, W597, T168-I174, L572, A573 y S584 a F588 de SEC ID NO. 1 o un fragmento o variante del mismo.

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

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

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

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

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

#### *Definición estructural del agente de la descripción*

40 Los agentes capaces de unirse a los epítipos definidos más arriba, se seleccionan del grupo que consiste en proteínas, péptidos, oligopéptidos, polipéptidos, anticuerpos, ARN antisentido, ADN antisentido, moléculas orgánicas pequeñas, ARNsi y receptores solubles seleccionados del grupo que consiste en receptores Trpv, receptores TrkA y receptores de dominio Vps10p y fragmentos y variantes de los mismos, o una combinación de los mismos.

En una realización, el agente de la descripción se selecciona del grupo que consiste en:

45 a. un polipéptido aislado seleccionado del grupo que consiste en

i. una secuencia de aminoácidos que consiste en SEC ID NOs.: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10;

ii. una variante de secuencia biológicamente activa de la secuencia de aminoácidos de a) en la que la variante tiene al menos 70% de identidad de secuencia respecto de dicha SEC ID NO.: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10;o

50 iii. un fragmento biológicamente activo de cualquiera de i o ii en el que dicho fragmento comprende al menos 50 aminoácidos contiguos de cualquiera de a) a b), y que tiene al menos 70% de identidad de secuencia respecto

de SEC ID NO.: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 en un intervalo de superposición de al menos 50 aminoácidos, en el que la actividad biológica es inhibir la formación del: complejo binario del receptor de dominio Vps10p : receptor Trpv, y/o el complejo ternario del receptor de dominio Vps10p : TrkA : receptor Trpv; o

5 b. un nucleótido aislado que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido como se define según a) o una secuencia de ácidos nucleicos que es una secuencia complementaria de una secuencia que codifica un polipéptido como se define según a), o

c. un vector de expresión que comprende la secuencia de ácidos nucleicos como se define según b), o

d. una composición de células, en la que dichas células son transformadas o transducidas con el vector como se define según c), o

10 e. una línea celular de empaquetado que comprende la secuencia de ácidos nucleicos como se define según b).

En otra realización, el polipéptido es una variante alélica de origen natural de la secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEC ID NO.: SEC ID NO.: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10.

15 En aún otra realización, el polipéptido es una variante de polipéptido que se describe en el mismo, en el que cualquier aminoácido especificado en la secuencia especificada es alterado para proporcionar una sustitución conservadora.

20 En una realización, el polipéptido tiene al menos 70% de identidad de secuencia, tal como 75% de identidad de secuencia, tal como 80% de identidad de secuencia, tal como 85% de identidad de secuencia, tal como 90% de identidad de secuencia, tal como 95% de identidad de secuencia, tal como 96% de identidad de secuencia, tal como 97% de identidad de secuencia, tal como 98% de identidad de secuencia, tal como 99% de identidad de secuencia, tal como 100% de identidad de secuencia respecto de una proteína que tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEC ID NO.: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10.

En una realización, el polipéptido es glicosilado.

En aún otra realización, polipéptido es un polipéptido soluble que es un fragmento de cualquiera de dicha SEC ID NO.: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10.

25 En aún otra realización, el polipéptido es capaz de formar al menos un puente de cistina intramolecular.

En aún otra realización, el polipéptido comprende un dímero de dicho polipéptido unido a al menos un puente de cistina intermolecular.

30 En aún otra realización, el polipéptido de la invención además comprende una cola de afinidad, tal como una cola polyhis, una cola GST, una cola HA, una cola Flag, una cola C-myc, una cola HSV, una cola V5, una cola de proteína de unión a maltosa, una cola del dominio de unión a celulosa.

En una realización, el agente de la descripción es un nucleótido que codifica un polipéptido que tiene al menos 70% de identidad de secuencia respecto de una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEC ID NO.: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10.

35 En otra realización, el nucleótido de la invención codifica un polipéptido que tiene al menos 70% de identidad de secuencia, tal como 75% de identidad de secuencia, tal como 80% de identidad de secuencia, tal como 85% de identidad de secuencia, tal como 90% de identidad de secuencia, tal como 95% de identidad de secuencia, tal como 96% de identidad de secuencia, tal como 97% de identidad de secuencia, tal como 98% de identidad de secuencia, tal como 99% de identidad de secuencia, tal como 100% de identidad de secuencia identidad de secuencia respecto de una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEC ID NO.: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10.

40 En aún otra realización el agente de la descripción es un vector que comprende la molécula de ácido nucleico como se define en la presente memoria más arriba.

En otra realización, el vector se selecciona del grupo que consiste en vectores obtenidos de la familia Retroviridae incluyendo lentivirus, HIV, SIV, FIV, EAV, CIV.

45 En otra realización, el vector se selecciona del grupo que consiste en alfavirus, adenovirus, virus adeno asociado, baculovirus, HSV, coronavirus, virus del papiloma bovino, Mo-MLV, preferentemente virus adeno asociado.

En otra realización, el vector comprende un promotor operativamente ligado a la molécula de ácido nucleico.

En una realización, dicho promotor se selecciona del grupo que consiste en: CMV, UbiC humano, RSV, promotor Tet regulable, Mo-MLV-LTR, MxI, EF-1 alfa, PDGF beta y CaMK II.

50 En una realización, el agente de la descripción es una célula transformada o transducida con uno o más vectores como se define en la presente memoria más arriba. Dicha célula puede ser implantada en un sujeto con el fin de

producir agentes polipeptídicos de acuerdo a la invención. Las células pueden, además, ser encapsuladas en una cápsula biocompatible y administradas al sujeto que lo necesita. De esta manera, el agente según la descripción se puede administrar localmente en el sistema nervioso central, evitando así las dificultades en el paso de la barrera hematoencefálica.

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

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

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

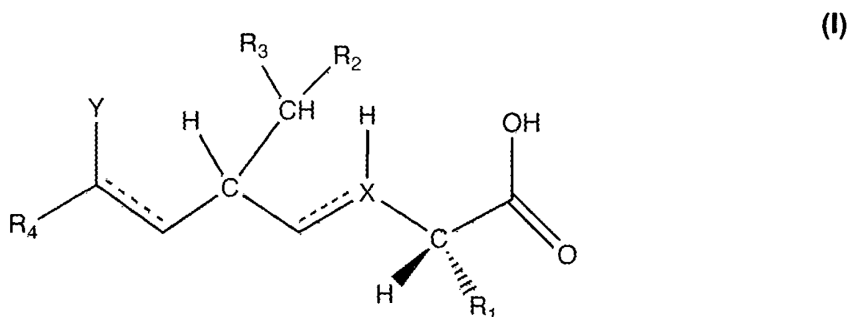
El uso de la realización 34 en la que dicha célula se selecciona del grupo que consiste en células CHO, CHO-K1, HEI193T, HEK293, COS, PC12, HiB5, RN33b y BHK.

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

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

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

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



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

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

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

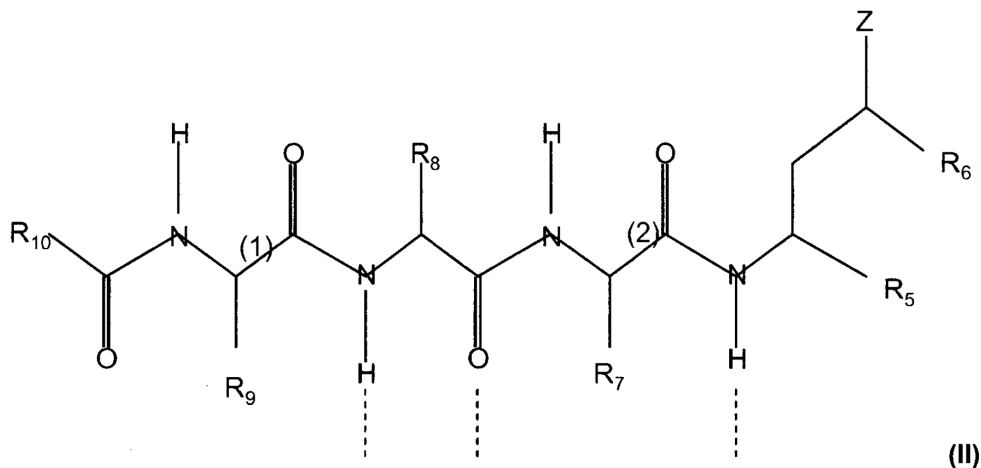
R<sub>2</sub> es un hidrógeno, un alquilo C1-12 o un aromático, un carbocíclico, una estructura heterocíclica o heteroaromática que tiene 1-3 anillos, 3-8 miembros anulares en cada uno y 0 a 4 heteroátomos, o un heteroalquilo que comprende 1 a 8 heteroátomos seleccionados del grupo que consiste en N,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

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

- 40 R<sub>4</sub> es seleccionado de los grupos funcionales alquilo lineal o ramificado C1-100, alqueno lineal o ramificado, alquino lineal o ramificado, fenilo, bencilo, haloalcano, cloroalcano, bromoalcano, yodoalcano, haloformilo, hidroxilo, carbonilo, aldehído, éster carbonato, carboxilato, carboxilo, éter, éster, hidroperoxi, peroxi, carboxamida, amina primaria, amina secundaria, amina terciaria, amonio, cetimina primaria, cetimina secundaria, aldimina primaria, aldimina secundaria, imida, azida, azo (diimida), cianato, isocianuro, isotiocianato, nitrato, nitrilo, nitrosooxi, nitro,

nitroso, priidilo, fosfino, fosfato, fosfono, sulfonilo, sulfinilo, sulfhidrilo (SH), tiocianato, disulfuro, un acoplador L2 o L3, y una secuencia de aminoácidos que es al menos 50% idéntica a SEC ID NO.: 10 o un fragmento de la misma.

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



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

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

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

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

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

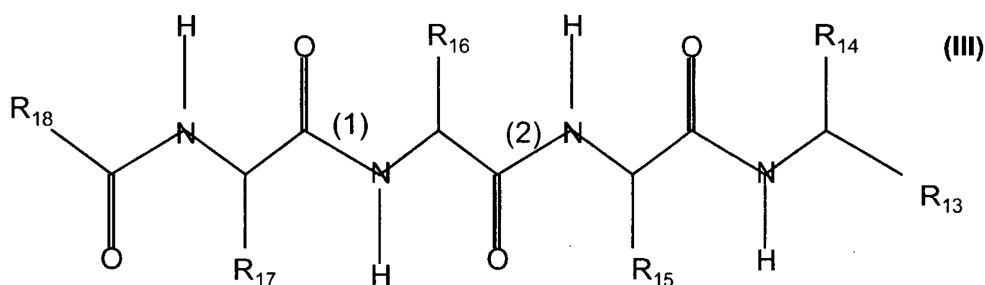
R<sub>9</sub> se selecciona del grupo que consiste en cadena lateral de lisina, arginina, glutamina, grupos heteroalifáticos y alifáticos C3-8, grupos heterocíclicos y carbocíclicos que comprende anillos de 5 o 6 miembros, y en el que

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

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

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

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



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

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

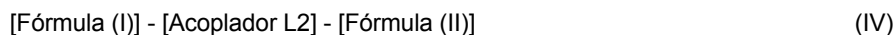
- 5 R<sub>16</sub> se selecciona del grupo que consiste en cadenas laterales de fenilalanina, leucina, isoleucina, valina, metionina, histidina, cisteína, lisina y alifático C3-7, y en el que

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

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

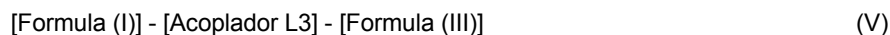
- 10 En una realización, el acoplador L2 mencionado en la presente memoria más arriba se selecciona del grupo que consiste en un esqueleto peptídico de 5 a 6 residuos, alquilo C15-20, alqueno C15-20 y alquino C15-20.

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



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

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



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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

#### Anticuerpos

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

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

Un aspecto de la descripción es proporcionar anticuerpos o equivalentes funcionales de los mismos que reconocen específicamente y se unen a epítomos de receptores de dominio Vps10p, receptores TRPV y un tercer componente al que los dos componentes anteriores de un complejo ternario pueden unirse. Un ejemplo de un tercer epítomo es el receptor TrkA.

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

- 15 Los anticuerpos monoclonales (Mab) son anticuerpos, en los que cada molécula de anticuerpo son similares y por lo tanto reconocen el mismo epítomo. Los anticuerpos monoclonales se producen en general por una línea de células de hibridoma. Los procedimientos de fabricación de anticuerpos monoclonales y células de hibridoma sintetizadoras de anticuerpos son bien conocidos para los expertos en la técnica. Los hibridomas productores de anticuerpos por ejemplo pueden prepararse mediante la fusión de un anticuerpo que produce linfocitos B con una línea celular de linfocitos B inmortalizada. Los anticuerpos monoclonales según la presente invención pueden prepararse por ejemplo como se describe en *Antibodies: A Laboratory Manual*, By Ed Harlow y David Lane, *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 1988. Dichos anticuerpos monoclonales pueden obtenerse de cualquier especie de mamífero adecuada, sin embargo frecuentemente los anticuerpos monoclonales serán anticuerpos de roedores por ejemplo anticuerpos monoclonales de rata o murinos. Se prefiere que los anticuerpos según la presente invención sean anticuerpos monoclonales o derivados de anticuerpos monoclonales.
- 20

- 25 Los anticuerpos policlonales es una mezcla de moléculas de anticuerpo que reconocen un antígeno dado específico, los anticuerpos policlonales pueden por lo tanto reconocer diferentes epítomos del antígeno dentro de dicho antígeno. En general, los anticuerpos policlonales se purifican a partir de suero de un mamífero, que ha sido previamente inmunizado con el antígeno. Los anticuerpos policlonales pueden por ejemplo prepararse mediante cualquiera de los procedimientos descritos en *Antibodies: A Laboratory Manual*, By Ed Harlow y David Lane, *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 1988. Los anticuerpos policlonales se pueden obtener de cualquier especie de mamífero apropiada, por ejemplo ratones, ratas, conejos, burros, cabras, ovejas, vacas o camellos. El anticuerpo preferentemente no se obtiene de una especie no mamífero, es decir, el anticuerpo no es por ejemplo preferentemente un anticuerpo de pollo. El anticuerpo también puede ser por ejemplo un anticuerpo policlonal artificial como por ejemplo se describe en el documento US 5.789.208 o US 6.335.163.
- 30

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

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

- 45 Los equivalentes funcionales de anticuerpos pueden en una realización preferente ser un fragmento de un anticuerpo, preferentemente un fragmento de unión al antígeno o una región variable. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos útiles con la descripción incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> y Fv. La digestión con papaína de los anticuerpos produce dos fragmentos idénticos de unión a antígeno, llamado el fragmento Fab, cada uno con un solo sitio de unión a antígeno, y un fragmento residual "Fc", llamado así por su capacidad para cristalizarse fácilmente. El tratamiento con pepsina produce un fragmento F(ab')<sub>2</sub> que tiene dos fragmentos de unión a antígeno que son capaces de reticular el antígeno, y otro fragmento residual (que se denomina pFc'). Los fragmentos adicionales pueden incluir diacuerpos, anticuerpos lineales, moléculas de anticuerpo de cadena única, anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos. Como se emplea en la presente memoria "fragmento funcional" con respecto a los anticuerpos, se refiere a fragmentos Fv, F(ab) y F(ab')<sub>2</sub>.
- 50

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

(1) Fab es el fragmento que contiene un fragmento de unión a antígeno monovalente de una molécula de anticuerpo. Un fragmento Fab se puede producir mediante la digestión del anticuerpo entero con la enzima papaína para

producir una cadena liviana intacta y una porción de una cadena pesada .

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

(3) (Fab')<sub>2</sub> es el fragmento de un anticuerpo que puede obtenerse tratando el anticuerpo entero con la enzima pepsina sin reducción posterior. F(ab')<sub>2</sub> es un dímero de dos fragmentos Fab' retenidos unidos por dos enlaces disulfuro.

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

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

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

#### *Anticuerpos humanos*

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

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

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

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

En otra realización, el agente anticuerpo de la descripción está dirigido al dominio intracelular del receptor de dominio Vps10p. Esta realización es particularmente útil para fines in vitro.

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

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

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

En otra realización, los anticuerpos monoclonales humanos están dirigidos contra un epítipo que comprende los

residuos de aminoácidos R325, S316, Y351, I353, K260, I327, F314, F350 a M363, S305, F306 y T398 a G400 de SEC ID NO.1 o un fragmento unido a membrana o soluble o una variante del mismo.

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

En otra realización, los anticuerpos monoclonales humanos están dirigidos contra un epítipo que comprende los residuos de aminoácidos L572, L114, V112, R109 a S111, S115 a G118, T570, G571, W586, W597, T168-I174, L572, A573 y S584 a F588 de SEC ID NO. 1 o un fragmento unido a membrana o soluble o variante del mismo.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

#### *Inmunizaciones*

55 Para generar anticuerpos monoclonales completamente humanos contra los epítopos de interés para la descripción, los ratones transgénicos o transcromosomales que contienen genes de inmunoglobulina humana (por ejemplo, ratones HCo12, HCo7 o KM) pueden inmunizarse con una preparación enriquecida del antígeno y/o células que expresan los epítopos de los receptores diana de la descripción, como se describe, por ejemplo, por Lonberg et al.

(1994), supra; Fishwild et al. (1996), supra, y el documento WO 98/24884. Por otra parte, los ratones pueden ser inmunizados con ADN que codifica el epítipo CaOU-1. Preferentemente, los ratones tendrán 6-16 semanas de edad en la primera infusión.

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

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

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

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

Para ambas regiones variables de cadena liviana y pesada, las secuencias de hebra codificantes optimizadas y correspondientes no codificantes se descomponen en 30-50 nucleótidos aproximadamente en el punto medio del oligonucleótido no codificante correspondiente. Por lo tanto, para cada cadena, los oligonucleótidos pueden ser ensamblados en conjuntos de hebra doble de superposición que abarcan segmentos de 150-400 nucleótidos. Las combinaciones se utilizan entonces como plantillas para producir productos de amplificación por PCR de 150-400 nucleótidos. Por lo general, un conjunto de oligonucleótidos de región variable simple se descompone en dos combinaciones que son amplificadas por separado para generar dos productos PCR de superposición. Estos productos solapantes se combinan a continuación mediante amplificación por PCR para formar la región variable completa. También puede ser deseable incluir un fragmento de la superposición de la región constante de cadena pesada o liviana (incluyendo el sitio BbsI de la cadena liviana kappa, o el sitio de AgeI de la cadena pesada gamma) en la amplificación por PCR para generar fragmentos que pueden ser fácilmente clonados en las construcciones de vectores de expresión.

Las regiones variables de cadena pesada y liviana reconstruidas se combinan entonces con secuencias promotoras

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

#### *Anticuerpos monovalentes*

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

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

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

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

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

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

#### *Multiespecificidad, incluyendo biespecificidad*

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

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

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

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

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

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

Un enfoque más eficiente para producir fragmentos de anticuerpos bivalentes o biespecíficos, que no impliquen etapas de ensamblaje químico in vitro, descrito por Holliger et al. (1993). Este enfoque tiene la ventaja de la observación de que los scFv secretada a partir de bacterias están a menudo presentes como monómeros y dímeros.

Esta observación sugirió que el  $V_H$  y  $V_L$  de diferentes cadenas podrían asociarse, formando de este modo dímeros y complejos más grandes. Los fragmentos de anticuerpos diméricos, también llamados "diacuerpos" por Hollinger et al., son en realidad pequeños fragmentos de anticuerpos bivalentes que se ensamblaron in vivo. Mediante la unión de  $V_H$  y  $V_L$  de dos anticuerpos diferentes 1 y 2, para formar cadenas "cruzadas"  $V_H 1V_L 2$  y  $V_H 2-V_L 1$ , se muestra el proceso de dimerización para volver a ensamblar sitios de unión a antígeno. La afinidad de los dos sitios de unión ha demostrado ser igual que los scFv de inicio, o incluso ser 10 veces mayor cuando se extrajo el acoplador de polipéptido que une covalentemente  $V_H$  y  $V_L$ , generando así dos proteínas consistiendo cada una en  $V_H$  directamente y covalentemente unido a  $V_L$  sin apareamiento con  $V_H$ . Esta estrategia de producir fragmentos de anticuerpos biespecíficos también fue descrita en varias solicitudes de patentes. La solicitud de patente WO 94 / 09131 (SCOTGEN LTD ; fecha de prioridad 15 de octubre 1992) se refiere a una proteína de unión biespecífica en la que los dominios de unión se obtienen de la región  $V_H$  y  $V_L$  presentes en dos cadenas o unidos en un scFv, mientras que otros dominios de anticuerpos fusionados, por ejemplo, dominios constantes de extremo terminal C, se utilizan para estabilizar las construcciones diméricas. La solicitud de patente WO 94/13804 (Cambridge Antibody Technology / Consejo de Investigación Médica, primera fecha de prioridad 4 de diciembre 1992) se refiere a un polipéptido que contiene un  $V_H$  y un  $V_L$  que son incapaces de relacionarse con los demás, por lo que los dominios V se pueden conectar con o sin un acoplador.

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

Las moléculas multiespecíficas descritas más arriba pueden fabricarse mediante varios procedimientos. Por ejemplo, todas las especificidades pueden ser codificadas en el mismo vector y, expresadas y ensambladas en la misma célula huésped. Este procedimiento es particularmente útil cuando la molécula multiespecífica es un mAb X mAb, mAb X Fab, Fab X F(ab')<sub>2</sub> o proteína de fusión Fab X ligando. Varios otros procedimientos para preparar anticuerpos bivalentes o multivalentes por ejemplo se describen en las Patentes Estadounidenses Nos. 5.260.203; 5,455,030; 4,881,175; 5.132.405; 5.091.513; 5,476,786; 5,013,653; 5.258.498; y 5.482.858.

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

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

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

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

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

Si bien se prefieren anticuerpos monoclonales humanos, otros anticuerpos que pueden ser empleados en las moléculas biespecíficas o multiespecíficas de la invención son anticuerpos murinos, quiméricos y humanizados monoclonales. Tales anticuerpos monoclonales murinos, quiméricos y humanizados se pueden preparar por procedimientos conocidos en la técnica. Las moléculas multiespecíficas y biespecíficas de la descripción se pueden fabricar utilizando técnicas químicas (véase por ejemplo, DM Kranz et al. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 78:5807), técnicas de "polidoma" (véase US 4.474.893), o técnicas de ADN recombinante.

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

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

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

#### *Marco de anticuerpo humanizado*

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

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

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

Es importante que los anticuerpos humanizados conserven alta afinidad para el antígeno y otras propiedades

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

Un procedimiento para humanizar MABs relacionados con la producción de anticuerpos quiméricos en los que un sitio de unión a antígeno que comprende los dominios variables completos de un anticuerpo están fusionados a los dominios constantes derivados de un segundo anticuerpo, preferentemente un anticuerpo humano. Los procedimientos para llevar a cabo tales procedimientos de quimerización se describen por ejemplo en los documentos EP-A-0 120 694 (Celltech Limited), EP-A-0 125 023 (Genentech Inc.), EP-A-0 171 496 (Res. Dev. Corp. Japan), EP-A-0173494 (Stanford University) y EP-A-0 194 276 (Celltech Limited). Una forma más compleja de humanización de un anticuerpo implica el re-diseño del dominio de región variable de modo que los aminoácidos que constituyen el sitio de unión del anticuerpo no humano se integran en el marco de una región variable de anticuerpo humano (Jones et al., 1986).

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

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

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

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

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

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

La célula huésped puede ser co-transfectada con los dos vectores de la invención, conteniendo el primer vector un operón que codifica una cadena ligera derivada de polipéptido y conteniendo el segundo vector un operón que codifica una cadena pesada derivada de un polipéptido. Los dos vectores contienen diferentes marcadores de detección, pero de otra manera, aparte de las secuencias codificadoras de cadena liviana y pesada de anticuerpo, son preferentemente idénticos, para garantizar, en la medida de lo posible, la igualdad de expresión de los polipéptidos de cadena liviana y pesada. Alternativamente, un vector simple puede ser utilizado, incluyendo el vector secuencias que codifican polipéptidos de cadena liviana y pesada. Las secuencias codificantes para las cadenas pesada y liviana pueden comprender ADNc o ADN genómico o.

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

Los procedimientos generales por los que los vectores de la invención se pueden construir, los procedimientos de transfección requeridos para producir la célula huésped de la invención y los procedimientos de cultivo necesarios para producir el anticuerpo de la invención a partir de tales células huésped son todos técnicas convencionales. Del

mismo modo, una vez producidos, los anticuerpos humanizados de la invención pueden purificarse de acuerdo a los procedimientos estándar como se describe a continuación.

#### Marco de anticuerpo humano

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

Los anticuerpos humanos mAb dirigidos contra proteínas humanas pueden ser generados utilizando ratones transgénicos que portan el sistema inmunológico humano completo en lugar del sistema de ratón. Los esplenocitos de estos ratones transgénicos inmunizados con el antígeno de interés se usan para producir hibridomas que secretan mAb humanos con afinidades específicas para epítomos de una proteína humana (véase, por ejemplo, 10 Wood et al. Solicitud Internacional WO 91/00906, Kucherlapati et al. PCT publication WO 91/10741; Lonberg et al. Solicitud Internacional WO 92/03918; Kay et al. Solicitud Internacional 92/03917; Lonberg, N. et al. 1994 Nature 368:856-859; Green, L. L. et al. 1994 Nature Genet. 7:13-21; Morrison, S. L. et al. 1994 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855; Bruggeman et al. 1993 Year Immunol 7:33-40; Tuailon et al. 1993 PNAS 90:3720-3724; Bruggeman et al. 1991 Eur J Immunol 21:1323-1326).

Tales ratones transgénicos están disponibles en Abgenix, Inc., Fremont, Calif., y Medarex, Inc., Annandale, N.J. Se ha descrito que la delección homocigota del gen de la región que se une a la cadena del anticuerpo (IH) en ratones 20 mutantes de línea germinal y quiméricos da como resultado la completa inhibición de la producción de anticuerpos endógenos. La transferencia del arreglo génico de inmunoglobulina de línea germinal humano en tales ratones mutantes de línea germinal resultará en la producción de anticuerpos humanos tras la exposición al antígeno. Véase, por ejemplo, Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:2551 (1993); Jakobovits et al., Nature 362:255-258 (1993); Bruggemann et al., Year in Immunol. 7:33 (1993); y Duchosal et al. Nature 355:258 (1992). Los anticuerpos humanos también se pueden obtener de bibliotecas de expresión de fagos s (Hoogenboom et al., J. Mol. Biol. 227: 381 (1991); Marks et al., J. Mol. Biol. 222:581-597 (1991); Vaughan, et al., Nature Biotech 14:309 (1996)).

- 25 Los inventores de esta solicitud han planteado anticuerpos contra varias partes del receptores de dominio Vps10p. En una realización, la presente invención está dirigida a anticuerpos contra la característica común de esta familia de receptores - el dominio Vps10p.

Tabla1: Anticuerpos contra receptores de dominio Vps10p

| Receptor  | Nombre      | Antígeno                                 | Especies | Western | IH/IC | Ref.                                            |
|-----------|-------------|------------------------------------------|----------|---------|-------|-------------------------------------------------|
| SorLA     | SORLA cabra | Dominio extracelular                     | cabra    | X       | X     | Schmidt et al., J.Biol.Chem. 282:32956-67, 2007 |
|           | Hale SORLA  | Dominio citoplásmico                     | conejo   | X       |       |                                                 |
|           | SORLA LA    | Repetición del tipo complementaria       | conejo   | X       |       |                                                 |
|           | Sol SORLA   | Dominio extracelular                     | conejo   | X       | X     | Andersen et al., PNAS103:13461-6, 2005          |
|           | Cola SORLA  | Dominio citoplásmico                     | conejo   | X       |       |                                                 |
|           | SORLA VPS   | Dominio VPS10p                           | conejo   | X       |       |                                                 |
|           | #606870     | Secuencia peptídica en el dominio Vps10p | conejo   | X       |       |                                                 |
|           | #642739     | C-terminal                               | conejo   | X       |       |                                                 |
|           | #643739     | Cola citoplásmica                        | conejo   | X       |       |                                                 |
|           | 20C11       | Dominio extracelular                     | ratón    | X       | X     |                                                 |
|           | AG4         | Dominio extracelular                     | ratón    | X       |       |                                                 |
| Sortilina | #5264       | Dominio extracelular                     | conejo   | X       | X     | Munck Petersen et al, EMBO J. 18 :595-604, 1999 |

ES 2 745 220 T3

|        |                        |                         |        |   |   |                                                                  |
|--------|------------------------|-------------------------|--------|---|---|------------------------------------------------------------------|
|        | #5448                  | Dominio citoplásmico    | conejo | X | X | Jansen et al, Nature Neurosci. 10 :1449 - 1457, 2007             |
|        | #5287                  | Dominio citoplásmico    | conejo | X |   |                                                                  |
|        | CP 96 334<br>SR 96 204 | propéptido              | Conejo | X |   | Munck Petersen et al, EMBO J. 18 :595-604, 1999                  |
|        | #5438                  | Vps10p                  | conejo | X |   |                                                                  |
|        | Sortilina cabra /Laika | Dominio extracelular    | cabra  | X |   |                                                                  |
|        | F9                     | Dominio extracelular    | ratón  | X | X |                                                                  |
|        | F11                    | Dominio extracelular    | ratón  | X | X |                                                                  |
|        | AF2934                 | Dominio extracelular    | cabra  | X | X | R&D Systems, Jansen et al, Nature Neurosci. 10 :1449- 1457, 2007 |
|        | AF3154                 | Dominio extracelular    | cabra  | X | X | R&D Systems; Jansen et al, Nature Neurosci. 10 :1449- 1457, 2007 |
|        | anti-NTR3              | Dominio extracelular    | ratón  | X | X | BD Transduction Laboratories,                                    |
|        | ANT-009                | Dominio extracelular    | ratón  | X | X | Alomone Labs; Nykjaer et al, Nature 427 :843-848, 2004           |
| SorCS1 | AF3457                 | Dominio extracelular    | cabra  | X | X | BD Transduction Laboratories                                     |
|        | SorCS1 cabra           | Dominio extracelular    | cabra  | X |   |                                                                  |
|        | L-SorCS1               | Dominio extracelular    | conejo | X | X | Hermey et al, J.Biol.Chem. 279:50221-50229, 2003                 |
|        | Leu-SorCS1             | Dominio rico en leucina | conejo | X | X | Hermey et al, J.Biol.Chem. 279:50221- 50229, 2003                |
|        | #5466                  | Dominio extracelular    | conejo | X | X |                                                                  |
|        | 1 D                    | Dominio extracelular    | ratón  | X |   |                                                                  |
|        | 4H                     | Dominio extracelular    | ratón  | X |   |                                                                  |
|        | 6B                     | Dominio extracelular    | ratón  | X |   |                                                                  |
|        | 4A                     | Dominio extracelular    | ratón  | X |   |                                                                  |
| SorCS2 | AF4237                 | Dominio extracelular    | oveja  | X |   | BD Transduction Laboratories                                     |
|        | SorCS2 cabra           | Dominio extracelular    | cabra  | X | X |                                                                  |
|        | #5422                  | Dominio extracelular    | conejo | X | X | Hermey et al, Biochem. J., 395:285-93, 2006                      |

|        |                    |                               |        |   |   |                                                                 |
|--------|--------------------|-------------------------------|--------|---|---|-----------------------------------------------------------------|
|        | #5431              | Aminoácidos del terminal C 28 | conejo | X | X |                                                                 |
|        | SorCS2-prp         | propéptido                    | conejo | X |   | Schousboe Sjoegaard, Dissertation, Aarhus University, 2005      |
|        | M1                 | Dominio extracelular          | ratón  |   | X | Roland Hoist, Master of Science Thesis, Aarhus University, 2006 |
|        | M3                 | Dominio extracelular          | ratón  |   | X | Roland Hoist, Master of Science Thesis, Aarhus University, 2006 |
|        | M4                 | Dominio extracelular          | ratón  |   | X | Roland Hoist, Master of Science Thesis, Aarhus University, 2006 |
|        | M7                 | Dominio extracelular          | ratón  |   | X | Roland Hoist, Master of Science Thesis, Aarhus University, 2006 |
|        | M9                 | Dominio extracelular          | ratón  |   | X | Roland Hoist, Master of Science Thesis, Aarhus University, 2006 |
|        | M10                | Dominio extracelular          | ratón  |   | X | Roland Hoist, Master of Science Thesis, Aarhus University, 2006 |
|        | M13                | Dominio extracelular          | ratón  | X |   | Roland Hoist, Master of Science Thesis, Aarhus University, 2006 |
|        | M15                | Dominio extracelular          | ratón  |   | X | Roland Hoist, Master of Science Thesis, Aarhus University, 2006 |
|        | M18                | Dominio extracelular          | ratón  | X | X | Roland Hoist, Master of Science Thesis, Aarhus University, 2006 |
|        | M19                | Dominio extracelular          | ratón  | X | X | Roland Hoist, Master of Science Thesis, Aarhus University, 2006 |
|        | S21                | Dominio extracelular          | ratón  | X |   | Roland Hoist, Master of Science Thesis, Aarhus University, 2006 |
|        | SorCS2-GST-73aa    | Dominio extracelular          | conejo | X |   |                                                                 |
|        | SorCS2-GST-100aa   | Dominio extracelular          | conejo | X |   |                                                                 |
|        | SorCS2-GST-172aa   | Dominio extracelular          | conejo | X |   |                                                                 |
| SorCS3 | SorCS3-N           | Dominio extracelular          | conejo | X |   |                                                                 |
|        | SorCS3-C           | 15 aminoácidos del terminal C | conejo | X |   |                                                                 |
|        | Sort3 N Term #5389 | Dominio terminal N            | conejo | X | X | Westergaard et al, FEBS Lett. 579:1172-6, 2005                  |

|  |              |                      |        |   |   |                                 |
|--|--------------|----------------------|--------|---|---|---------------------------------|
|  | #5432        | Dominio extracelular | conejo | X | X |                                 |
|  | MAB3067      | Dominio extracelular | ratón  | X |   | BD Transduction<br>Laboratories |
|  | MAB30671     | Dominio extracelular | ratón  | X |   | BD Transduction<br>Laboratories |
|  | AF3326       | Dominio extracelular | cabra  | X |   | BD Transduction<br>Laboratories |
|  | SorCS3 cabra | Dominio extracelular | cabra  | X |   |                                 |

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

Tabla 2: Anticuerpos contra los receptores TrpV1

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

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

5

Tabla 3: Anticuerpos contra TrkA

| Receptor | Nombre  | Antígeno             | Especie | Western | IH/IC | Ref.     |
|----------|---------|----------------------|---------|---------|-------|----------|
| TrkA     | 250893  | Dominio extracelular | Conejo  | X       | X     | ABBIOTEC |
|          | Ab43416 | Dominio extracelular | Ratón   | X       | X     | Abcam    |
|          | Ab72122 | Dominio extracelular | Conejo  | X       | X     | Abcam    |
|          | Ab8871  | Dominio extracelular | Conejo  | X       | X     | Abcam    |
|          | Ab36961 | Dominio extracelular | Conejo  | X       | X     | Abcam    |
|          | Ab72162 | Dominio extracelular | Conejo  | X       | X     | Abcam    |

|  |         |                      |        |   |   |                           |
|--|---------|----------------------|--------|---|---|---------------------------|
|  | AB72160 | Dominio extracelular | conejo | X | X | Abcam                     |
|  | Sc20539 | Dominio extracelular | Cabra  | X | X | Santa Cruz<br>Biotechnoly |
|  | Sc14024 | Dominio extracelular | Conejo | X | X | Santa Cruz<br>Biotechnoly |
|  | Sc80961 | Dominio extracelular | Ratón  | X | X | Santa Cruz<br>Biotechnoly |
|  | Sc20537 | Dominio extracelular | cabra  | X | X | Santa Cruz<br>Biotechnoly |
|  | Sc80398 | Dominio extracelular | ratón  | X | X | Santa Cruz<br>Biotechnoly |
|  | Sc80399 | Dominio extracelular | ratón  | X | X | Santa Cruz<br>Biotechnoly |
|  | MAB175  | Dominio extracelular | Ratón  | X | X | R&D systems               |
|  | AF175   | Dominio extracelular | cabra  | X | X | R&D systems               |
|  | MAB1751 | Dominio extracelular | Ratón  | X | X | R&D systems               |
|  | AF1056  | Dominio extracelular | Cabra  | X | X | R&D systems               |
|  | BAF1056 | Dominio extracelular | Cabra  | X | X | R&D systems               |
|  | MAB1056 | Dominio extracelular | ratón  | X | X | R&D systems               |

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

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

#### *Procedimientos para preparar anticuerpos*

- 10 Los anticuerpos monoclonales y policlonales dirigidos contra un antígeno específico, o epítipo de un antígeno, se pueden producir de acuerdo a procedimientos estándar (véase por ejemplo, anticuerpos - Antibodies - A laboratory Manual by Ed Harlow y David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory 1998, ISBN 0-87969-314-2). El procedimiento para la posterior generación de anticuerpos humanizados o fragmentos del mismo también se ha descrito (por ejemplo A. M. Scott et al, Cancer Research 60:3254-3261, 2000; A. Nissim y Y. Chernajovsky, Handb. Exp. Pharmacol. 181:3-18, 2008; A. Mountain y J. R. Adair, Biotechnol. Genet. Eng. Rev. 10:1-142, 1992).

- 15 *Expectativas generales de éxito en la fabricación de anticuerpos*

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

- 25 Los ensayos de detección de anticuerpos inhibidores son de conocimiento común y normalmente implican un ensayo inmunosorbente ligado a la enzima (ELISA). En detalle, el receptor o un fragmento recombinante que abarca su motivo de unión a ligando se inmoviliza en pocillos duplicados de placas de microtitulación. Posteriormente, los pocillos se incuban con una solución que contiene el ligando. La unión del ligando al receptor inmovilizado se confirma utilizando un anticuerpo que reconoce el ligando y que es acoplado con una reacción de color de tinte. La

unión del ligando al receptor se prueba en presencia de diversos anticuerpos para identificar las especies de inmunoglobulina que bloquean la unión del ligando al receptor y por lo tanto prevenir la reacción de color en la respectiva placa de microtitulación.

*Uso clínico exitoso de anticuerpos*

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

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

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

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

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

En otra realización de la descripción el anticuerpo está dirigido contra el receptor TrkA .

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

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

25

Procedimientos de detección de agentes/antagonistas/inhibidores del complejo del receptor de dominio Vps10p : receptor Trpv

30 La descripción proporciona dianas específicas y procedimientos para detectar y evaluar agentes candidatos capaces de unirse a una entidad del complejo binario del receptor de dominio Vps10p : receptor Trpv, y/o complejo ternario del receptor de dominio Vps10p : TrkA : receptor Trpv inhibiendo de ese modo la formación de dicho complejo, para la preparación de un medicamento para el tratamiento del dolor en un mamífero.

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

35

Con este fin las bibliotecas de detección de agentes candidatos están disponibles para su compra en el mercado. Si una biblioteca es una biblioteca de péptidos o una biblioteca química no tiene ningún impacto en la situación actual ya que la detección de bibliotecas químicas es también el trabajo de rutina. De hecho la detección de bibliotecas químicas es un servicio ofrecido por las empresas comerciales, y se desprende de su material de presentación (Véase, por ejemplo <http://www.analyticon.com/>) que no tienen en cuenta el trabajo de detección como inventivo.

40

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

- i. proporcionar un receptor de dominio Vps10p y un receptor Trpv, o
- 45 ii. proporcionar un receptor de dominio Vps10p y un receptor Trpv y un receptor TrkA, y
- iii. proporcionar una biblioteca de agentes potenciales, y
- iv. proporcionar un ensayo para medir la unión de una primera entidad receptor de dominio Vps10p a una segunda entidad receptor Trpv, o
- v. proporcionar un ensayo para medir la unión de una primera entidad receptor Trpv a una segunda entidad
- 50 receptor de dominio Vps10p, o

- vi. proporcionar un ensayo para medir la unión de una primera entidad receptor Trpv a una segunda entidad (receptor de dominio Vps10p : receptor TrkA) complejo binario, o
- vii. proporcionar un ensayo para medir la unión de una primera entidad complejo binario (receptor de dominio Vps10p : receptor TrkA) a una segunda entidad receptor Trpv, o
- 5 viii. proporcionar un ensayo para medir la unión de una primera entidad receptor de dominio Vps10p a una segunda entidad complejo binario (TrpV : receptor TrkA), o
- ix. proporcionar un ensayo para medir la unión de una primera entidad complejo binario (TrpV : receptor TrkA) a una segunda entidad receptor de dominio Vps10p, o
- 10 x. proporcionar un ensayo para medir la unión de una primera entidad receptor TrkA a una segunda entidad complejo binario (TrpV : receptor de dominio Vps10p), o
- xi. proporcionar un ensayo para medir la unión de una primera entidad complejo binario (TrpV : receptor de dominio Vps10p) a una segunda entidad receptor TrkA, y
- xii. añadir la biblioteca de agentes potenciales que deben ser ensayados al ensayo seleccionado de iv a xi, y
- xiii. determinar la cantidad de dicha primera entidad respecto de dicha segunda entidad, y
- 15 xiv. comparar la cantidad determinada en la etapa xiv) con una cantidad medida en ausencia del agente que debe ser ensayado,
- xv. en el que la diferencia en las dos cantidades identifica un agente que altera la unión de la primera entidad a la segunda entidad.
- 20 En otro aspecto la invención se refiere a un procedimiento para determinar el grado de inhibición de un agente de la invención, sobre la actividad de un receptor de dominio Vps10p en un cultivo celular que expresa dicho receptor, en el que dicho receptor de dominio Vps10p comprende una secuencia de aminoácidos que tienen al menos 60% de identidad de secuencia respecto de SEC ID NO. 1, SEC ID NO. 2, SEC ID NO. 3, SEC ID NO. 4 o SEC ID NO. 5, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:
  - a. proporcionar un cultivo celular que expresa un receptor de dominio Vps10p, y
  - 25 b. proporcionar un agonista del receptor de dominio Vps10p, y
  - c. proporcionar una biblioteca de agentes potenciales, y
  - d. proporcionar un ensayo para la determinación de la unión a, internalización de y señalización a través de, un receptor de dominio Vps10p, comprendiendo dicho ensayo
  - 30 e. añadir la biblioteca de agentes potenciales que deben ser ensayados c) al cultivo celular a), en presencia del agonista b), y
  - f. determinar
    - i. la cantidad de agente unido al receptor de dominio Vps10p, y/o
    - iv. la cantidad de agente internalizado por el receptor de dominio Vps10p, y/o
    - v. el grado de señalización a través del receptor de dominio Vps10p, y
  - 35 g. comparar la cantidad determinada en la etapa f) con una cantidad medida en ausencia de los agentes que deben ser ensayados,
  - h. en el que la diferencia en las dos cantidades identifica un agente
    - i. capaz de la unión a un receptor de dominio Vps10p, y/o
    - iv. capaz de inhibir la señalización a través de un receptor de dominio Vps10p, y/o
    - 40 v. capaz de inhibir la internalización de un agonista de dicho receptor de dominio Vps10p.
- 45 En aun otro aspecto la descripción se refiere a un procedimiento para determinar el grado de inhibición de un agente de la descripción como se define en la presente memoria más arriba, sobre la actividad de un receptor Trpv en un cultivo celular que expresa dicho receptor, en el que dicho receptor Trpv comprende una secuencia de aminoácidos que tienen al menos 70% de identidad de secuencia respecto de SEC ID NO. 6, SEC ID NO. 7, SEC ID NO. 8 o SEC ID NO. 9, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:

- a. proporcionar un cultivo celular que expresa un receptor Trpv, y
  - b. proporcionar un agonista del receptor Trpv, y
  - c. proporcionar una biblioteca de agentes potenciales, y
  - d. proporcionar un ensayo para la determinación de la unión a un receptor Trpv, comprendiendo dicho ensayo
  - 5 e. añadir la biblioteca de agentes potenciales que deben ser ensayados c) al cultivo celular a), en presencia del agonista b), y
  - f. determinar la cantidad de agente unido al receptor Trpv y
  - g. comparar la cantidad determinada en la etapa f) con una cantidad medida en ausencia del agente que debe ser ensayado,
  - 10 h. en el que la diferencia en las dos cantidades identifica un agente capaz de unirse a un receptor Trpv.
- En otro aspecto la descripción se refiere a un procedimiento para determinar el grado de inhibición de un agente como se define en la presente memoria más arriba sobre la actividad de un receptor TrkA en un cultivo celular que expresa dicho receptor, en el que dicho receptor TrkA comprende una secuencia de aminoácidos que tienen al menos 70% de identidad de secuencia respecto de SEC ID NO. 10, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:
- 15 a. proporcionar un cultivo celular que expresa un receptor TrkA, y
  - b. proporcionar un agonista del receptor TrkA, y
  - c. proporcionar una biblioteca de agentes potenciales, y
  - d. proporcionar un ensayo para la determinación de la unión a un receptor TrkA, comprendiendo dicho ensayo
  - 20 e. añadir la biblioteca de agentes potenciales que deben ser ensayados c) al cultivo celular a), en presencia del agonista b), y
  - f. determinar la cantidad de agente unido al receptor TrkA y
  - g. comparar la cantidad determinada en la etapa f) con una cantidad medida en ausencia del agente que debe ser ensayado, en el que la diferencia en las dos cantidades identifica un agente capaz de unirse a un receptor TrkA.
  - 25 En un aspecto adicional la descripción se refiere a un procedimiento para determinar el grado de inhibición de un agente como se define en la presente memoria más arriba sobre la actividad de un receptor de dominio Vps10p en un cultivo celular que expresa dicho receptor y con un cultivo celular que carece de la expresión de dicho receptor, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:
  - a. proporcionar un cultivo celular que expresa un receptor de dominio Vps10p, y
  - 30 b. proporcionar un cultivo celular que no expresa un receptor de dominio Vps10p, y
  - c. opcionalmente proporcionar un cultivo celular que sobreexpresa un receptor de dominio Vps10p
  - d. proporcionar un agonista para la sensación de dolor del receptor de dominio Vps10p, y
  - e. proporcionar una biblioteca de agentes potenciales, y
  - f. proporcionar un primer ensayo que comprende a) y un segundo ensayo que comprende b) y opcionalmente un
  - 35 tercer ensayo que comprende c), y
  - g. añadir la biblioteca de agentes potenciales que deben ser ensayados a los tres ensayos, y
  - h. determinar
    - i. la cantidad de agente unido al receptor de dominio Vps10p, y/o
    - iv. la cantidad de agente internalizado por el receptor de dominio Vps10p, y/o
  - 40 v. el grado de señalización a través del receptor de dominio Vps10p, y
  - i. comparar la cantidad de agente determinada en la etapa g) utilizando a) con la cantidad determinada en g) utilizando b) y la cantidad determinada en g) utilizando c),

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

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

- 5      a.      proporcionar a un mamífero que expresa un receptor de dominio Vps10p, y
- b.      proporcionar a un mamífero que no expresa un receptor de dominio Vps10p, y
- c.      proporcionar a un mamífero que sobreexpresa un receptor de dominio Vps10p, y
- d.      proporcionar un agonista para la sensación de dolor del receptor de dominio Vps10p, y
- e.      proporcionar una biblioteca de agentes potenciales, y
- 10     f.      administrar dicha biblioteca de agentes a dicho mamífero de a), b) y c) respectivamente, y
- g.      determinar el grado de señalización de dolor a través del receptor de dominio Vps10p, en cada uno de los mamíferos definidos en a), b) y c), utilizando
  - i.      ensayo de von Frey y/o
  - ii.     ensayo de inmersión de cola y/o
- 15     iii.     ensayo de placa caliente, y
- h.      comparar el grado de señalización de dolor en la etapa g) utilizando a) con el grado determinado en g) utilizando b) con el grado determinado en g) utilizando c),
- en el que la diferencia en el grado de inhibición identifica un agente capaz de unirse a un receptor de dominio Vps10p, inhibiendo la señalización a través de un receptor de dominio Vps10p.
- 20     En aun otro aspecto la descripción se refiere a un procedimiento para determinar el grado de inhibición de un agente como se define en la presente memoria más arriba sobre la actividad de un receptor Trpv en un mamífero que expresa dicho receptor con un segundo mamífero que carece de la expresión de dicho receptor y un tercer mamífero que sobreexpresa dicho receptor, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:
- a.      proporcionar a un mamífero que expresa un receptor Trpv, y
- 25     b.      proporcionar a un mamífero que no expresa un receptor Trpv, y
- c.      proporcionar a un mamífero que sobreexpresa un receptor Trpv, y
- d.      proporcionar un agonista para la sensación de dolor of el receptor Trpv, y
- e.      proporcionar una biblioteca de agentes potenciales, y
- f.      administrar dicha biblioteca de agentes a dicho mamífero de a), b) y c) respectivamente, y
- 30     g.      determinar el grado de dolor señalización a través del receptor Trpv, en cada uno de los mamíferos definidos en a), b) y c), utilizando ensayo de von Frey y/o Ensayo de inmersión de cola y/o Ensayo de placa caliente, y
- h.      comparar el grado de señalización de dolor en la etapa g) utilizando a) con el grado determinado en g) utilizando b) con el grado determinado en g) utilizando c),
- en el que la diferencia en el grado de inhibición identifica un agente capaz de unirse a un receptor Trpv e inhibir la señalización a través de dicho receptor Trpv.
- 35     En otro aspecto la presente descripción se refiere a un procedimiento para determinar el grado de inhibición de un agente como se define en la presente memoria más arriba, sobre la actividad de un complejo binario de receptor de dominio Vps10p : receptor Trpv en un mamífero que expresa dichos receptores con un segundo mamífero que carece de la expresión de dichos receptores y un tercer mamífero que sobreexpresa dichos receptores, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:
- 40     a.      proporcionar a un primer y un segundo mamífero que expresan tanto un receptor Trpv y un receptor de dominio Vps10p, y
- b.      proporcionar a un primer y un segundo mamífero que carecen de la expresión de un receptor Trpv y un receptor de dominio Vps10p, y
- 45     c.      proporcionar a un primer y un segundo mamífero que sobreexpresan un receptor Trpv y un receptor de dominio

Vps10p, y

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

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

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

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

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

utilizando

10 i. ensayo de von Frey y/o

iv. ensayo de inmersión de cola y/o

v. ensayo de placa caliente, y

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

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

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

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

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

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

Ratón knock-out SorCS1-2

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

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

En una realización adicional la invención se refiere a un procedimiento para detectar un agente candidato para la habilidad de reducir el dolor en el ratón transgénico como se define en la presente memoria más arriba que comprende:

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

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

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

45 En un aspecto la descripción se refiere a un procedimiento para detectar un agente candidato por la capacidad de reducir el dolor en un ratón transgénico SorCS1-2 como se define en la presente memoria más arriba que comprende las etapas de :

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

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

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

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

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

Ratón que sobreexpresa Sortilina o SorCS1 o SorCS2

15 En otro aspecto principal la descripción se refiere a un ratón transgénico para la sobreexpresión condicional u obligada de Sortilina o SorCS1 o SorCS2 en tejidos neuronales.

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

20 Composición farmacéutica y formas de administración

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

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

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

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

Formulaciones

40 Si bien es posible que los compuestos o sales de la descripción que se van a administrar como producto químico en bruto, es preferible presentarlos en forma de una formulación farmacéutica. Por consiguiente, la descripción proporciona además una formulación farmacéutica, para aplicación medicinal, que comprende un compuesto de la descripción o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, como se define en la presente memoria, y un vehículo farmacéuticamente aceptable para ello.

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

50 Preferentemente, la composición será de aproximadamente 0,5% a 75% en peso de un compuesto o compuestos de la invención, consistiendo el resto en excipientes farmacéuticos adecuados. Para la administración oral, tales

excipientes incluyen grados farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, talco, celulosa, glucosa, gelatina, sacarosa, carbonato de magnesio, y similares.

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

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

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

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

Los compuestos de la descripción pueden formularse para administración parenteral (por ejemplo, por inyección, por ejemplo inyección de bolo o infusión continua) y pueden presentarse en forma de dosis unitaria en ampollas, jeringas precargadas, infusión de pequeño volumen o en recipientes de dosis múltiples con un conservante añadido. Las composiciones pueden tomar formas tales como suspensiones, soluciones, o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, soluciones por ejemplo en polietilenglicol acuoso. Los ejemplos de vehículos aceitosos o no acuosos, diluyentes, disolventes o vehículos incluyen propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales (por ejemplo, aceite de oliva), y ésteres orgánicos inyectables (por ejemplo, oleato de etilo), y pueden contener agentes de formulación tal como conservantes, humectantes, agentes emulsionantes o de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes. Alternativamente, el ingrediente activo puede estar en forma de polvo, obtenido por aislamiento aséptico de sólido estéril o por liofilización a partir de solución para la constitución antes del uso con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua estéril libre de pirógenos.

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

Los jabones apropiados para su uso en formulaciones parenterales incluyen metal alcalino graso, amonio, y sales de trietanolamina, y los detergentes adecuados incluyen (a) detergentes catiónicos tal como, por ejemplo, haluros de dimetil dialquil amonio, haluros de alquil piridinio; (b) detergentes aniónicos tal como, por ejemplo, alquilo, arilo, y sulfonatos de olefina, alquilo, olefina, éter, sulfatos de monoglicéridos y, sulfosuccinatos, (c) detergentes no iónicos tal como, por ejemplo, óxidos de aminas grasas, alcanolamidas de ácidos grasos, y copolímeros de

polioxietileno-polipropileno, (d) detergentes anfotericos tal como, por ejemplo, alquil-beta-aminopropionatos, sales de 2-alquilimidazolina amonio cuaternario, y (e) mezclas de los mismos.

- Las formulaciones parenterales contendrán típicamente desde aproximadamente 0,5 a aproximadamente 25 % en peso del ingrediente activo en solución. Pueden ser utilizados conservantes y tampones. Con el fin de minimizar o eliminar la irritación en el sitio de la inyección, tales composiciones pueden contener uno o más tensioactivos no iónicos que tienen un balance hidrófilo-lipófilo (HLB) de aproximadamente 12 a aproximadamente 17. La cantidad de tensioactivo en tales formulaciones variará típicamente de aproximadamente 5% a aproximadamente 15 % en peso. Los tensioactivos adecuados incluyen ésteres de ácidos grasos de polietilen sorbitán, tal como monooleato de sorbitán y aductos de alto peso molecular de óxido de etileno con una base hidrofóbica, formados por la condensación de óxido de propileno con propilenglicol. Las formulaciones parenterales se pueden presentar en dosis unitarias o recipientes cerrados de múltiples dosis, tal como ampollas y viales, y se pueden almacenar en una condición secada por congelación (liofilizado) que requiere sólo la adición del excipiente líquido estéril, por ejemplo, agua, para inyecciones, inmediatamente antes de su uso. Las soluciones de inyección extemporáneas pueden prepararse a partir de polvos estériles, gránulos, y comprimidos del tipo descrito previamente.
- Los compuestos de la invención también se pueden administrar por vía tópica. Las regiones para la administración tópica incluyen la superficie de la piel y también los tejidos de membranas mucosas de la vagina, recto, nariz, boca y garganta. Las composiciones para la administración tópica a través de las membranas mucosas y piel no deberían dar lugar a signos de irritación, tal como hinchazón o enrojecimiento.
- La composición tópica puede incluir un vehículo farmacéuticamente aceptable adaptado para la administración tópica. Por lo tanto, la composición puede tomar la forma de una suspensión, solución, pomada, loción, lubricante sexual, crema, espuma, aerosol, supositorio, implante, inhalante, comprimido, cápsula, polvo seco, jarabe, bálsamo o pastilla, por ejemplo. Los procedimientos para preparar tales composiciones son bien conocidos en la industria farmacéutica.
- Los compuestos de la descripción se pueden formular para la administración tópica a la epidermis como ungüentos, cremas o lociones, o como un parche transdérmico. Los ungüentos y cremas pueden, por ejemplo, ser formulados con una base acuosa u oleosa con la adición de adecuados agentes espesantes y/o agentes gelificantes. Las lociones pueden ser formuladas con una base acuosa u oleosa en general también contienen uno o más agentes emulsionantes, agentes estabilizantes, agentes dispersantes, agentes de suspensión, agentes espesantes, o agentes colorantes. Las formulaciones adecuadas para la administración tópica en la boca incluyen pastillas que comprenden agentes activos en una base aromatizada, normalmente sacarosa y acacia o tragacanto; pastillas que comprenden el ingrediente activo en una base inerte tal como gelatina y glicerina o sacarosa y goma arábica; y enjuagues bucales que comprenden el ingrediente activo en un vehículo líquido adecuado.
- Cremas, pomadas o pastas según la descripción son formulaciones semisólidas del ingrediente activo para aplicación externa. Ellos se pueden hacer mezclando el ingrediente activo en forma finamente dividida o en polvo, solo o en solución o suspensión en un fluido acuoso o no acuoso, con la ayuda de maquinaria adecuada, con una base grasa o no grasa. La base puede comprender hidrocarburos tal como parafina dura, blanda o líquida, glicerina, cera de abejas, jabón metálico ; un mucílago ; un aceite de origen natural tal como aceite de almendras, maíz, cacahuete, ricino u oliva; grasa de lana o sus derivados o un ácido graso tal como ácido estérico u oleico junto con un alcohol tal como propilenglicol o un macrogel. La formulación puede incorporar cualquier agente activo superficial adecuado tal como un tensioactivo aniónico, catiónico o no iónico tal como éster de sorbitán o un derivado de polioxietileno del mismo. Los agentes de suspensión tal como gomas naturales, derivados de celulosa o materiales inorgánicos tal como sílices silíceas, y otros ingredientes tal como lanolina también pueden ser incluidos.
- Las lociones según la descripción incluyen aquellas adecuadas para la aplicación a la piel o el ojo. Una loción ocular puede comprender una solución acuosa estéril que opcionalmente contiene un bactericida y se puede preparar por procedimientos similares a aquellos para la preparación de gotas. Las lociones o linimentos para aplicación a la piel también pueden incluir un agente para acelerar el secado y enfriar la piel, tal como un alcohol o acetona, y un humectante tal como glicerol o un aceite de ricino de tal como aceite o aceite de cacahuete.

#### Administración transdérmica

- Los complejos modificadores químicos- agentes farmacéuticos que se describen en la presente memoria se pueden administrar por vía transdérmica. La administración transdérmica implica típicamente la entrega de un agente farmacéutico para el paso percutánea del fármaco en la circulación sistémica del paciente. Los sitios de la piel incluyen regiones anatómicas para la administración por vía transdérmica del medicamento e incluyen el antebrazo, abdomen, pecho, espalda, glúteos, zona mastoidal, y similares.
- La administración transdérmica se lleva a cabo mediante la exposición de una fuente del complejo a la piel de un paciente durante un período prolongado de tiempo. Los parches transdérmicos tienen la ventaja añadida de proporcionar la entrega controlada de un complejo modificador químico-agente farmacéutico al cuerpo. Ver *Transdermal Drug Delivery: Developmental Issues and Research Initiatives*, Hadgraft y Guy (eds.), Marcel Dekker, Inc., (1989); *Controlled Drug Delivery: Fundamentals and Applications*, Robinson y Lee (eds.), Marcel Dekker Inc.,

(1987); y *Transdermal Delivery of Drugs*, Vols. 1-3, Kydonieus y Berner (eds.), CRC Press, (1987). Tales formas de dosificación se pueden preparar por disolución, dispersión, o de otra manera incorporando el complejo modificador químico-agente farmacéutico en un medio adecuado, de tal como un material de matriz elastomérica. Los potenciadores de la absorción también pueden ser usados para aumentar el flujo del compuesto a través de la piel. La velocidad de tal flujo puede ser controlada proporcionando una velocidad de control de membrana o dispersando el compuesto en una matriz polimérica o gel.

#### Administración transdérmica pasiva del fármaco

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

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

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

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

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

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

Los materiales de membrana permeables adecuados pueden seleccionarse basándose en el grado deseado de permeabilidad, la naturaleza del complejo, y las consideraciones mecánicas relacionadas con la construcción del dispositivo. Los materiales de membrana permeables ejemplares incluyen una amplia variedad de polímeros naturales y sintéticos, tal como polidimetilsiloxanos (cauchos de silicona), copolímero de acetato de etilenvinilo (EVA), poliuretanos, copolímeros de poliéter-poliuretano, polietilenos, poliamidas, cloruros de polivinilo (PVC), polipropilenos, policarbonatos, politetrafluoroetilenos (PTFE), materiales celulósicos, por ejemplo, triacetato de celulosa y nitrato / acetato de celulosa, e hidrogeles, por ejemplo, 2-hidroxietilo (HEMA).

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

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

vierte entonces en moldes de tamaño conveniente, se deja enfriar, y solidificar.

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

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

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

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

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

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

- 35 Sales farmacéuticamente aceptables

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

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

- 45 Los compuestos de la invención se pueden administrar en forma de un metal alcalino o sal de metal alcalino térreo del mismo, concurrentemente, simultáneamente, o junto con un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable, especialmente y preferentemente s en la forma de una composición farmacéutica del mismo, ya sea por vía oral, rectal, o parenteral (incluyendo la subcutánea), en una cantidad eficaz.

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

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

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

- En una realización de la descripción el pH de la composición farmacéutica como se define en la presente memoria más arriba está entre pH 5 y pH 9.
- En una realización la composición farmacéutica como se define en la presente memoria más arriba se formula para la administración por inyección, supositorio, administración oral, comprimido sublingual o pulverizador, administración cutánea, inhalación o para la administración local utilizando una cápsula biocompatible implantable.
- En otra realización la inyección es la intravenosa, intramuscular, intraespinal, intraperitoneal, subcutánea, un bolo o una administración continua.
- En una realización la composición farmacéutica según la descripción se administra en intervalos de 30 minutos a 24 horas.
- En otra realización la composición farmacéutica según la descripción se administra en intervalos de 1 a 6 horas.
- En una realización, la composición farmacéutica como se define en la presente memoria más arriba se administra en intervalos de 6 a 24 horas.
- En otra realización la composición farmacéutica según la descripción se administra en intervalos de 6 a 72 horas.
- En otra realización, la composición farmacéutica como se define en la presente memoria más arriba se administra en intervalos de 1 a 7 días, tal como cada 2 días, por ejemplo cada 4 días, tal como cada 6 días.
- En una realización, la duración del tratamiento con la composición farmacéutica como se define en la presente memoria más arriba es de 1 a 52 semanas.
- En una realización, la duración del tratamiento con la composición farmacéutica como se define en la presente memoria más arriba es de 25 a 104 semanas.
- En una realización, la duración del tratamiento con la composición farmacéutica como se define en la presente memoria más arriba es de 2 a 7 años.
- En una realización, la duración del tratamiento con la composición farmacéutica como se define en la presente memoria más arriba es de por vida.
- En una realización la composición farmacéutica que comprende el antagonista/inhibidor del receptor de dominio Vps10p de acuerdo a la descripción se administra en una dosificación de entre 10 µg a 500 mg por kg de masa corporal.
- En otra realización, la dosificación del principio activo de la composición farmacéutica según la descripción está entre 10 µg a 500 mg por kg de masa corporal, tal como 20 µg a 400 mg por kg de masa corporal, por ejemplo de 50 µg a 200 mg por kg de masa corporal, tal como de 70 µg a 100 mg por kg de masa corporal.
- Segundo principio activo
- En una realización la composición farmacéutica como se define en la presente memoria más arriba comprende un segundo principio activo.
- En otra realización dicho segundo principio activo se selecciona del grupo que consiste en antidepresivos, anticonvulsivos, anestésicos locales, opiodes, antagonistas de NMDA, Tramadol, capsazepina, y capsaicina.
- En otra realización de la descripción los antidepresivos como se define en la presente memoria más arriba se seleccionan del grupo que consiste en antidepresivos tricíclicos y amitriptilina.
- En otra realización de la descripción los anticonvulsivos como se define en la presente memoria más arriba se seleccionan del grupo que consiste en Gabapentina, carbamazepina, fenioina, y lamotrigina.
- En otra realización de la descripción los anestésicos locales como se define en la presente memoria más arriba se seleccionan del grupo que consiste en lidocaína y mexiletina.
- En otra realización de la descripción los opiodes como se define en la presente memoria más arriba se seleccionan del grupo que consiste en morfina, fentanilo y oxicodona.
- En otra realización de la descripción los antagonistas de NMDA como se define en la presente memoria más arriba se seleccionan del grupo que consiste en ketamina, memantina y amantadina.
- En un aspecto importante la descripción se refiere al uso de el al menos un agente como se define en la presente memoria más arriba en el que dicho agente es capaz de inhibir la expresión del receptor de dominio Vps10p o un receptor Trpv o un receptor TrkA en un animal.

## Kit de partes

En un aspecto la descripción se refiere a un kit en partes que comprende:

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

## Procedimiento de tratamiento

En un aspecto la presente invención se refiere a un uso en el tratamiento de dolor en un sujeto que comprende administrar a un individuo que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición farmacéutica en la presente memoria más arriba.

En un aspecto, la presente invención se refiere a un uso en el tratamiento de neuropatía administrando a un individuo que lo necesita una cantidad suficiente del agente como se define en la presente memoria más arriba.

## Procedimiento comercial

En un aspecto, la descripción se refiere a un procedimiento para la comercialización de un medicamento, comprendiendo dicho producto al menos un agente aislado, siendo dicho agente capaz de inhibir la formación del:

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

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

## Descripción detallada de los dibujos

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

Figura 2: experimentos colP que demuestran la interacción física entre sortilina, TrkA y TrpV1 en células HEK293 transfectadas doble con los receptores indicados. (A) sortilina y TrkA. (B) TrpV1 y TrkA o sortilina, respectivamente.

Figura 3: Representación esquemática de complejos diméricos y triméricos entre Sortilina, TrkA y TrpV1 en la membrana plasmática. (A) Sortilina y TrpV1. (B) TrkA y TrpV1. (C) Sortilina, TrkA y TrpV1, indicado con TrkA como componente intermedio. (D) Sortilina, TrkA y TrpV1 indicado con TrpV1 como componente central.

Figura 4: Datos de inmunofluorescencia y estereológicos que demuestran la expresión de sortilina, TrkA y TrpV1 en los cuerpos celulares de las neuronas sensoriales en los ganglios radicales posteriores (DRG). (A) recuento de % de perfiles neuronales positivos de cada receptor en DRG. (B) Inmunohistología de DRG demostrando sortilina, TrkA y TrpV1 en pequeñas neuronas sensoriales medianas en DRG

Figura 5: (A) ensayo de placa caliente y (B) ensayo de retirada de cola realizada en ratones con sortilina (+ / +) y con sortilina (-/-). La falta del receptor de sortilina resulta claramente en una mayor latencia hacia el estímulo térmico doloroso, de manera similar se observó el fenotipo en ratones TrpV1 (-/-). (C) No se observó ningún cambio en la respuesta al estímulo mecánico (de von Frey) a partir de la pérdida de sortilina, en correspondencia a la observación de TrpV1 (-/-), que ilustra que TrpV1 sólo está implicada en la señalización del estímulo térmico/ químico y no mecánico y la pérdida de sortilina tiene el mismo fenotipo selectivo.

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

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

(B) Desarrollo de la hiperalgesia térmica en los ratones descritos en (A). El umbral de retirada de la extremidad

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

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

#### Perspectiva general de secuencias

SEC ID NO. 1: Sortilina

SEC ID NO. 2: SorLA

SEC ID NO. 3: SorCS1

- 15 SEC ID NO. 4: SorCS2

SEC ID NO. 5: SorCS3

SEC ID NO. 6: TrpV1

SEC ID NO. 7: TrpV2

SEC ID NO. 8: TrpV3

- 20 SEC ID NO. 9: TrpV4

SEC ID NO. 10: TrkA

#### Ejemplos

Ejemplo 1: Determinación de si la Sortilina, TrkA y TrpV1 son capaces de interactuar físicamente

- 25 Células HEK293 establemente transfectadas con combinaciones de sortilina, TrkA y TrpV1 se reticularon con DSP (Pierce) y los lisados celulares se sometieron a inmunoprecipitación utilizando anti-TrkA o anti-TrpV1 (Santa Cruz Biotechnology) y perlas de Sepharose GammabindG (G & E Biosciences). El eluato IP y los lisados se sometieron a SDS-PAGE y Western Blot. Se demostraron los complejos de Sortilina-TrkA (Fig. 2A), TrpV1-sortilina y TrpV1-TrkA (Fig. 2B), lo que sugiere que estos receptores son capaces de la formación de complejos diméricos y triméricos entre sí.

- 30 Ejemplo 2: Determinación de si la inactivación de sortilina afecta la expresión de TrkA y TrpV1

- Los ratones adultos fueron decapitados, el DRG lumbar se diseccionó, se fijó y se crio seccionó a las 15 pm. La expresión de Sortilina, TrkA y TrpV1 se realizó mediante la incubación con anticuerpo primario (anti-sortilina de Alomone Labs, anti-TrkA de Reichardt Lab en UCSF y anti-TrpV1 de Neuromics Lab) seguido por el anticuerpo secundario etiquetado con fluorescencia de Molecular Probes. Las muestras se cubrieron y las imágenes se adquirieron en un microscopio confocal Zeiss LSM510. La Figura 4b ilustra la expresión de sortilina, TrkA y TrpV1 en las neuronas L4 DRG y se puede ver que estas moléculas están todas expresadas en neuronas de tamaño pequeño y medio (= nociceptivas). No se observó ninguna diferencia en el número de neuronas positivas para TrkA y TrpV1 entre ratones de tipo salvaje y con Sortilina (-/-), ambos demostraron un perfil de expresión como se demuestra en la figura 4a (a excepción de sortilina que está ausente en ratones con sortilina (- / -) (datos no mostrados)).

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

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

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

Ensayo de von Frey: el umbral de retirada mecánica sobre la superficie plantar de las patas traseras se midió utilizando pelos de von Frey calibrados 0,008 g - 1,4 g (Touch-Test® Sensory Evaluators, North Coast Medical, CA).

Los pelos de Von Frey que aumentaban la fuerza de flexión se aplicaron cada uno 5 veces para ambos lados de la zona de la extremidad trasera plantar desde abajo al suelo de malla, y se contó el número de retiradas.

- 5 Como se muestra en la Figura 5a y 5b, los ratones con sortilina (- / -) mostraron una disminución significativa en la respuesta al estímulo térmico respecto de la cola o pata trasera mientras que la respuesta a la estimulación mecánica fue inalterada. Este cambio en el fenotipo sensorial es paralelo a aquel observado en ratones con TrpV1 (- / -), lo que sugiere fuertemente que la inactivación de sortilina da como resultado un fenotipo similar a aquel de TRPV1 (- / -) y por lo tanto que la sortilina está involucrada en la regulación funcional de TrpV1 (Caterina et al. (2000) Science 288, 306-313).

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

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

Ejemplo 5a: Demostración de un complejo de receptor Sortilina:TrkA:TrpV1

- 20 Las células que expresan sortilina, TrkA y TrpV1, por ejemplo, después de la transfección con plásmidos que codifican los tres receptores, respectivamente, son reticulados con DSP (Pierce) y posteriormente son lisados. El lisado celular se incuba con el anticuerpo contra sortilina unido covalentemente a perlas de sefarosa. Los complejos precipitados se eluyen (eluato 1) a partir de las perlas lavadas (tampón ácido y posterior neutralización) y se someten a otra ronda de inmunoprecipitación utilizando anticuerpo anti-TrkA y las proteínas precipitadas se eluyen (eluato 2) con tampón de carga de SDS. El eluato 1 se compone de sortilina precipitada sola y/o sortilina-TrkA, complejos de sortilina-TrkA-TrpV1 y sortilina-TrpV1 mientras que el eluato 2 sólo contiene los complejos sortilina-TrkA y/o sortilina-TrkA-TrpV1. El análisis Western blot de TrpV1 en el eluato 2 revela la formación de un complejo receptor ternario entre Sortilina, TrkA y TrpV1.

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

- 30 La determinación de la unión, internalización o señalización por miembros de la familia del receptor de dominio Vps10p se puede realizar en los sistemas celulares. Las células que expresan sortilina, TrkA y TrpV1 después de por ejemplo transfección con plásmidos que codifican los tres receptores, respectivamente, se incuban con un compuesto del agente candidato (inhibidor / antagonista). Dicho agente puede, por ejemplo, representar un anticuerpo contra cualquiera de los receptores, ligandos de unión Sortilina y TrkA tal como proNGF, NGF o, fragmentos de los respectivos receptores. Después de la incubación, las células se lavan, complejos de proteínas se reticulan con DSP (Pierce) y posteriormente se lisan. El lisado celular se incuba con el anticuerpo contra sortilina unido covalentemente a perlas de sefarosa. Los complejos precipitados se eluyen (eluato 1) a partir de las perlas lavadas (tampón de ácido y posteriormente la neutralización) y se someten a otra ronda de inmunoprecipitación utilizando anticuerpo anti-TrkA y proteínas precipitadas eluidas (eluato 2) con tampón de carga SDS. El eluato 1 se compone de sortilina precipitada sola y/o sortilina - TrkA, sortilina - TrpV1 y complejos de sortilina - TrkA - TrpV1 mientras que el eluato 2 sólo contiene sortilina - TrkA y/o complejos de sortilina - TrkA - TrpV1. El análisis Western blot de TrkA y TrpV1 en eluato 1 revela si los compuestos candidatos son capaces de inhibir la formación de sortilina - TrkA y el complejo sortilina - TrpV1, respectivamente. El análisis Western blot de TrpV1 en eluato 2 revela si los compuestos candidatos son capaces de inhibir la formación del complejo ternario sortilina - TrkA - TrpV1.

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

- 50 Las células que expresan sortilina y TrpV1 con o sin TrkA, por ejemplo, después de la transfección con plásmidos que codifican los receptores relevantes se incuban en ausencia o presencia de antagonistas candidatos. Las células se monitorean posteriormente por cambios en flujo de calcio mediado por TRPV1 utilizando AM-Fura2. En resumen, las células transfectadas de manera estable con TrpV1, TrkA y Sortilina se colocan en una placa de cultivo de tejido de fondo transparente de 96 pocillos (Sigma) y se incuban en medio de Dulbecco de Eagle con 1 µM AM-Fura2 (Molecular Probes) a 37 °C en la oscuridad durante 30 minutos. Antes de las mediciones de [Ca<sup>2+</sup>], las células se lavan tres veces y se incuban durante 30 minutos a temperatura ambiente (25 °C) en solución salina fisiológica tamponada con HEPES (HPSS : NaCl, 120 mM ; KCl, 5,4 mM ; Mg<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,8 mM ; HEPES, 20 mM ; CaCl<sub>2</sub>, 1,8 mM ; glucosa y, 10 mM ; con pH 7,4). Las células se estimulan con el agonista de TrpV1 capsaicina y/o agonista de TrkA NGF y/o otros compuestos candidatos, la fluorescencia se monitorea de inmediato en un lector de placas Victor Multilabel (PerkinElmer) mediante excitación alternativamente mediante longitud de onda de 340 y 380 nm y midiendo la intensidad de fluorescencia de emisión a 510 nm. Todos los experimentos son conducidos a temperatura

ambiente (25 ° C) y se realizan dentro de 2 horas de carga para cada cubreobjetos. Los datos se expresan como la relación de fluorescencia de Fura2 debido a la excitación a 340 nm y aquella debido a la excitación a 380 nm (F340/F380). La eficacia de los antagonistas candidatos en NGF o el influjo de calcio estimulado con capsaicina se puede determinar comparando la actividad de AM-Fura2 en ausencia o presencia del antagonista que debe ser ensayado.

Ejemplo 5d: procedimiento de detección basado en vivo para la identificación de agentes que interrumpen la formación de complejos entre Sortilina y TrpV1, y/o Sortilina, TrkA y/o TrpV1, respectivamente

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

Ejemplo 6: Un ensayo in vitro para la identificación de agentes que interrumpen la formación de complejos entre, Sortilina y TrpV1, y Sortilina, TrkA y/o TrpV1, respectivamente.

La determinación de la unión directa de un ligando tal como una molécula orgánica pequeña, un péptido o un receptor soluble incluyendo pero sin limitarse a Sortilina, TRPV y TrkA, a la proteína inmovilizada se puede realizar por ejemplo, análisis de resonancia de plasmón superficial (Biacore, Suecia) utilizando CaHBS como tampón de desarrollo estándar (HEPES 10 mM, pH 7,4, NaCl 140 mM, CaCl<sub>2</sub> 2 mM, EGTA 1 mM, y 0,005% de Tween-20). Un chip biosensor de Biacore (CM5, cat. no. BR-1000-14) se activa utilizando el procedimiento NHS / EDC tal como lo describe el proveedor, seguido por el revestimiento con receptor que pertenece al receptor de la familia de dominio Vps10p. Se pueden aplicar varias metodologías diferentes: Los agentes candidatos pueden ser identificados comparando la señal de unión (unidades de respuesta) con un chip inmovilizado con uno de los receptores y comparando esta señal con una célula de flujo de vacío. En otra metodología, la inhibición de un ligando establecido puede ser monitoreada en ausencia o presencia de inhibidores putativos. La diferencia en la señal representa el potencial inhibidor del antagonista. Los datos recogidos se analizaron mediante el ajuste de sensogramas para las estimaciones de afinidad y potencial inhibidor utilizando el programa Biaevaluation versión 3.1.

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

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

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

## Ejemplo 8: Procedimientos de tratamiento

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

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

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

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

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

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

## Ejemplo 8A: Tratamiento profiláctico en caso de lesión accidental del nervio

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

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

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

## Ejemplo 8B: Toracotomía planificada para el funcionamiento del corazón

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

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

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

## Ejemplo 8C: tratamiento de un paciente con síntomas de dolor neuropático

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

45 El paciente está en tratamiento con 2800 mg de gabapentina diaria. El tratamiento amortigua la intensidad del dolor, pero aún así el dolor invalida la vida cotidiana. La intensidad del dolor se vuelve insoportable con el uso del brazo que luego exige opiáceos para amortiguar.

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

Ejemplo 9: Determinación del desarrollo de alodinia mecánica e hiperalgesia térmica después de la ligadura del nervio espinal

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

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

## Referencias

- [1] Dworkin, R.H. "An overview of neuropathic pain: syndromes, symptoms, signs, and several mechanisms", Clin. J. Pain 18:343-349 (2002)
- [2] Green, B.G. "Temperature perception and nociception", J. Neurobiol 61:13-29. (2004.)
- [3] Tegeder, I., Costigan, M., Griffin, R.S., Abele, A., Belfer, I., Schmidt, H., Ehner, C., Nejim, J., Marian, C., Scholz, J., Wu, T., Allchorne, A., Diatchenko, L., Binshtok, A.M., Goldman, D., Adolph, J., Sama, S., Atlas, S.J., Carlezon, W.A., Parsegian, A., Lotsch, J., Fillingim, R.B., Maixner, W., Geisslinger, G., Max, M.B., Woolf, C.J. "GTP cyclohydrolase and tetrahydrobiopterin regulate pain sensitivity and persistence", Nature Medicine 1:1269-77 (2006).
- [4] Bisgaard, T., Rosenberg, J and Kejlet, H. "From acute to chronic pain after Laparoscopic cholecystectomy: a prospective follow-up analysis". Scand. J Gastroenterol. 40:1358-1364 (2005)
- [5] Devor, M. & Seltzer, Z. Textbook of pain. Wall, P.D. & Melzack, R.(eds.). Elsevier Science (1999).
- [6] Raja, S.N., Meyer, R.A., Ringkamp, M., & Campbell, J.N. Textbook of pain. Wall, P.D. & Melzack, R.(eds.). Elsevier Science (1999).
- [7] Jensen, T.S. & Baron, R. "Translation of symptoms and signs into mechanisms in neuropathic pain", Pain 102:1-8 (2003).
- [8] Zimmermann, M. "Pathobiology of neuropathic pain", Eur. J. Pharmacol. 429:23-37 (2001)
- [9] Dickenson, A.H., Matthews, E.A. & Suzuki, R. Neurobiology of neuropathic pain: mode of action of anticonvulsants. European Journal of Pain-London 6.
- [10] [10] Lai, J., Porreca, F., Hunter, J.C. & Gold, M.S. "Voltage-gated sodium channels and hyperalgesia", Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 44:371-397 (2004)
- [11] McCleane, G. "Pharmacological management of neuropathic pain", CNS. Drugs 17:1031-1043 (2003)
- [12] Mattia, C. & Coluzzi, F. "Antidepressants in chronic neuropathic pain", Mini. Rev. Med. Chem. 3:773-784 (2003)
- [13] Tamayo, N., Liao, H., Stec, M.M., Wang, X., Chakrabarti, P., Retz, D., Doherty, E.M., Surapaneni, S., Tamir, R., Bannan, A.W., Gavva, N.R., Norman, M.H. "Design and synthesis of peripherally restricted transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) antagonists", J.Med Chem. 2008, 51:2744-57).
- [14] Scholz, J. and Woolf, C.J. "Can we conquer pain?" Nat Neurosci 5 Suppl. 1062-7
- [15] Hald, A., Nedergaard, S., Hansen, R.R., Ding, M., Heegaard, A.-M. "Differential activation of spinal cord glial cells in murine models of neuropathic and cancer pain", Eur. J. Pain in press (2008)
- [16] Smeyne, R.J., Klein, R., Schnapp, A., Long, L.K., Bryant, S., Lewin, A., Lira, S.A. Barbacid, M. "Severe sensory and sympathetic neuropathies in mice carrying a disrupted Trk/NGF receptor gene", Nature 368:246-9 (1994).
- [17] Arnett, M.G., Ryals, J.M., Wright, D.E. "pro-NGF, sortilin, and p75<sup>NTR</sup>: Potential mediators of injury-induced apoptosis in the rat dorsal root ganglion". Brain Research 1183:32-42 (2007).
- [18] Petersen et al., J. Biol. Chem., 272:3599-3605 (1997)

- [19] Herman-Borgmeyer et al., Mol. Brain Res., 65:216-219 (1999)
- [20] Jacobsen et al., J. Biol. Chem., 271:31379-31383 (1996)
- [21] Marcusson, E.G., et al., Cell, 77:579-586 (1994)
- [22] J. Mazella et al., J Biol Chem 273, 26273 (1998).
- 5 [23] C. Munck Petersen et al., Embo J 18, 595 (1999).
- [24] Nykjaer et al., Nature 427, 843 (2004).
- [25] H. K. Teng et at., J Neurosci 25, 5455 (2005).
- [26] U. B. Westergaard et at., J Biol Chem 279, 50221 (2004).
- [27] S. Maeda et at., J Cell Physiol 193, 73 (2002).
- 10 [28] M. S. Nielsen, C. Jacobsen, G. Olivecrona, J. Gliemann, C. M. Petersen, J Biol Chem 274, 8832 (1999).
- [29] M. S. Nielsen et al., Embo J 20, 2180 (2001).
- [30] K. Nakamura, K. Namekata, C. Harada, T. Harada, Cell Death Differ 14, 1552 (2007).
- [31] P. Jansen et at., Nat Neurosci 10, 1449 (2007).
- [32] P. Chalon et at., FEBS Lett 386, 91 (1996).
- 15 [33] L. Jacobsen et al., J Biol Chem 276, 22788 (2001).
- [34] K. Tanaka, M. Masu, S. Nakanishi, Neuron 4, 847 (1990).
- [35] J. P. Vincent, J. Mazella, P. Kitabgi, Trends Pharmacol Sci 20, 302 (1999).
- [36] Willer et at. (2008) Nature Genetics 40(2): 161-169
- [37] Kathiresan et al. (2008) Nature Genetics 40(2): 189-97
- 20 [38] U.B. Westergaard, K. Kirkegaard, E.S. Sorensen, C. Jacobsen, M.S. Nielsen, C.M. Petersen, P. Madsen, (2005) FEBS Letters 579:1172-1176
- [39] Chao, M.V. "Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways", Nat Rev Neurosci. 4:299-309 (2003)
- 25 [40] Huang, E.J., Reichardt, L.F. "Trk receptors: roles in neuronal signal transduction", Annu Rev Biochem. 72:609-42 (2003)
- [41] Huang, E.J., Reichardt, L.F. "Neurotrophins: roles in neuronal development and function", Annu Rev Neurosci. 24:677-736 (2001)
- [42] Chuang, H.H., Prescott, E.D., Kong, H., Shields, S., Jordt, S.E., Basbaum, A.I., Chao, M.V., Julius, D. "Bradykinin and nerve growth factor release the capsaicin receptor from PtdIns(4,5)P2-mediated inhibition", Nature 411:957-62 (2001).
- 30 [43] Dhaka, A., Viswanath, V., Patapoutian, A. "Trp ion channels and temperature sensation", Annu Rev Neurosci. 29:135-61 (2006)
- [44] Patapoutian, A., Peier, A.M., Story, G.M., Viswanath, V. "ThermoTRP channels and beyond: mechanisms of temperature sensation" Nature Reviews Neuroscience 4:529-539 (2003)

**REIVINDICACIONES**

1. Un anticuerpo IgG monoclonal, IgG humanizado o IgG recombinante que se une al receptor Sortilina para su uso en el tratamiento de dolor neuropático en un mamífero.
2. El anticuerpo para su uso según la reivindicación 1, en donde el dolor es dolor crónico.
- 5 3. El anticuerpo para su uso según la reivindicación 1, en donde el dolor neuropático se selecciona del grupo que consiste en dolor neuropático periférico, dolor neuropático central y dolor neuropático mixto.
4. El anticuerpo para su uso según la reivindicación 1, en donde el dolor neuropático se debe a lesión mecánica a los nervios periféricos o centrales, lesión metabólica, lesión infecciosa o invasión de cáncer de nervios por tratamiento de tumores y citotóxico.
- 10 5. El anticuerpo para su uso según la reivindicación 4, en donde la lesión mecánica se debe a lesiones accidentales, compresión o axotomía.
6. El anticuerpo para su uso según la reivindicación 5, en donde la axotomía es amputación u operación.
7. El anticuerpo para su uso según la reivindicación 6, en donde la lesión metabólica se debe a neuropatía diabética.
- 15 8. El anticuerpo para su uso según la reivindicación 7, en donde la lesión infecciosa se debe a herpes zóster y neuropatía por HIV.
9. El anticuerpo para su uso según la reivindicación 1, en donde el dolor es dolor agudo.
10. El anticuerpo para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el mamífero es un ser humano.

20

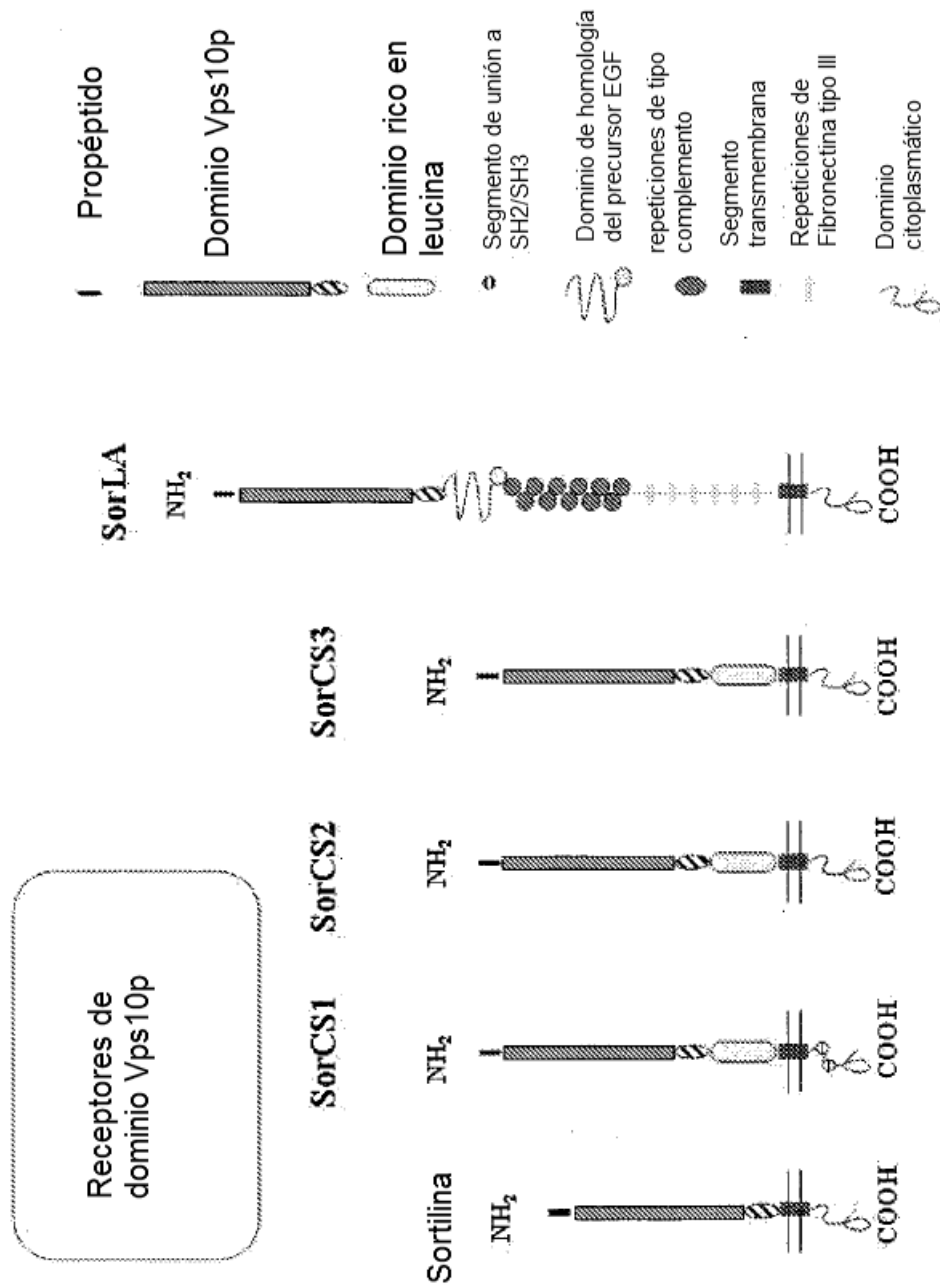
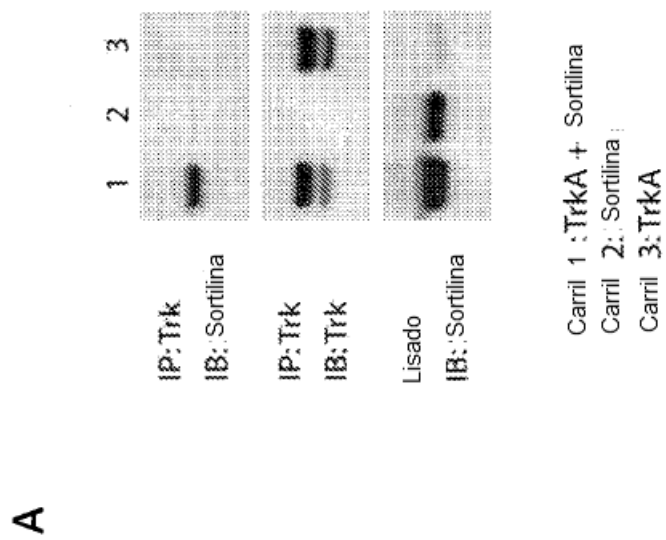
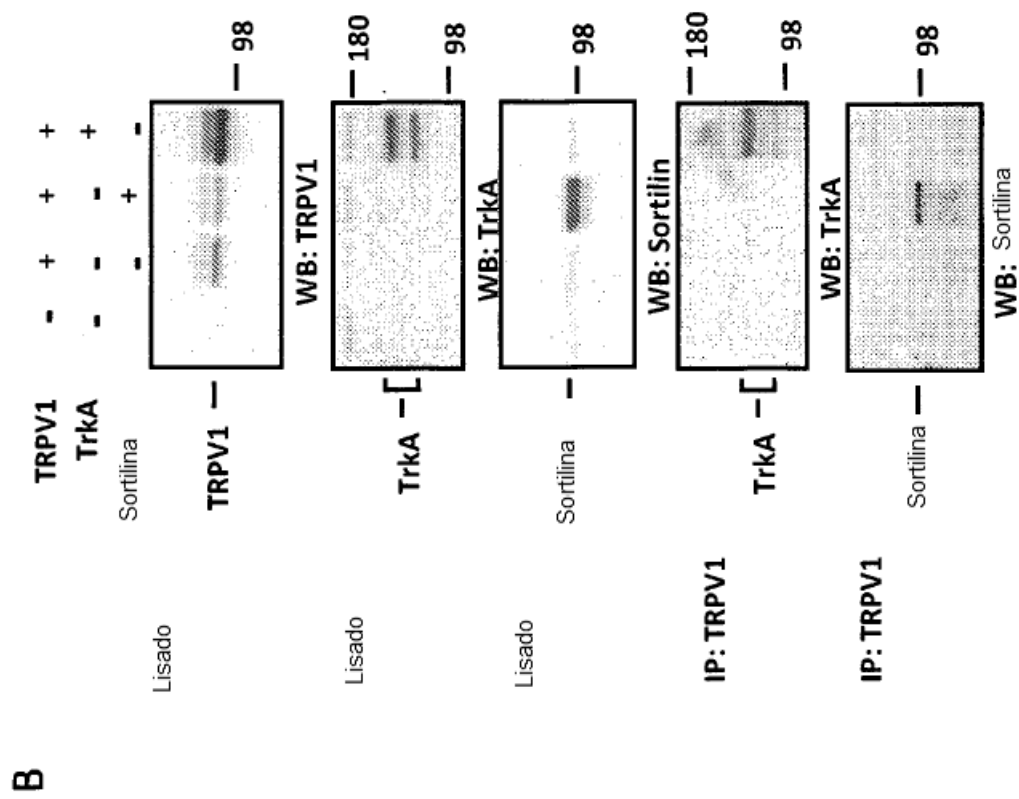


Fig. 1



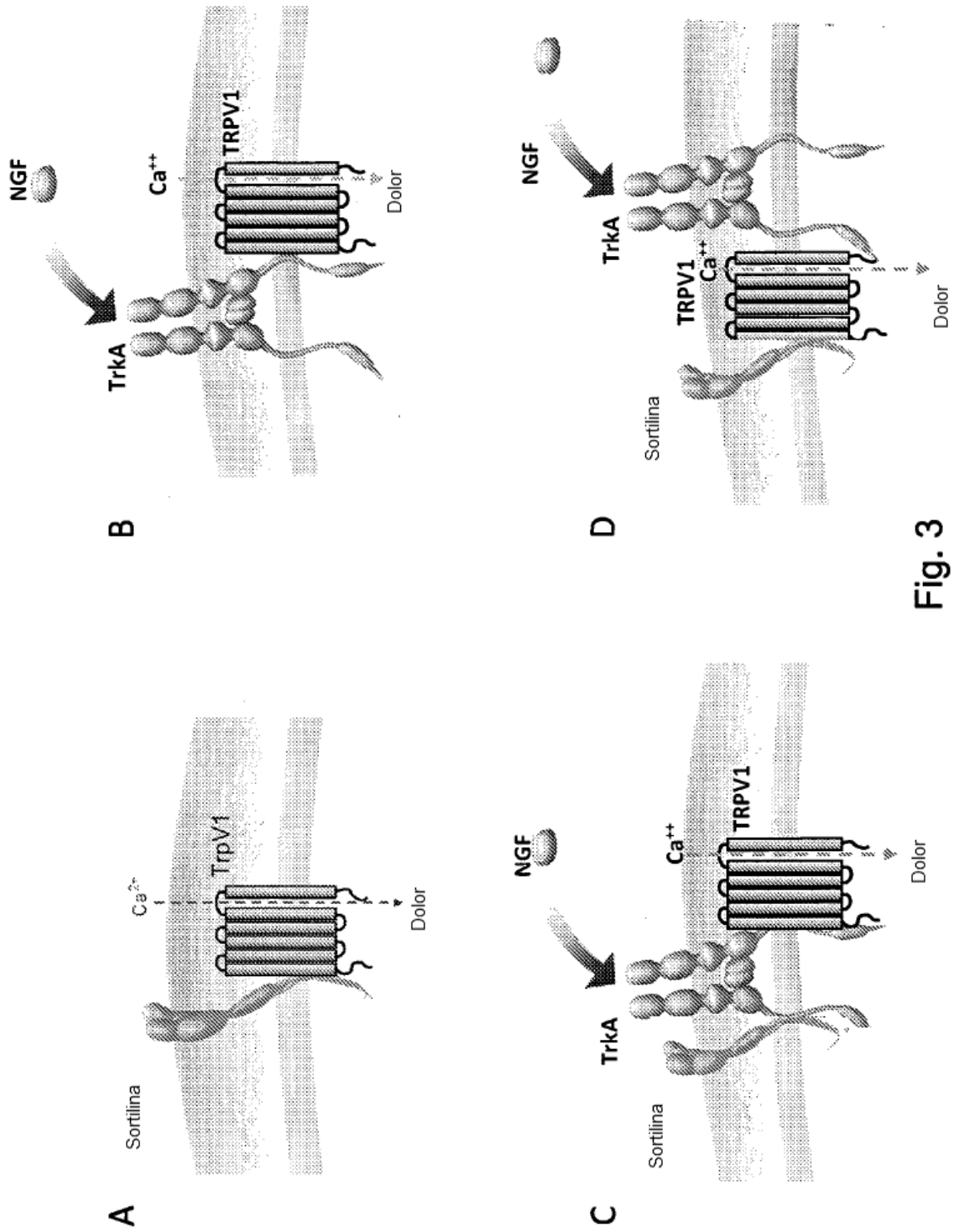


Fig. 3

# Perfil de ganglios radicales posteriores

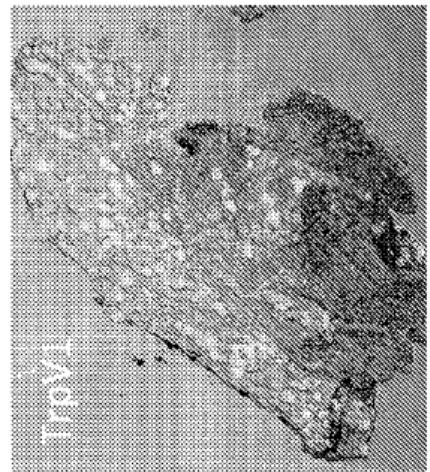
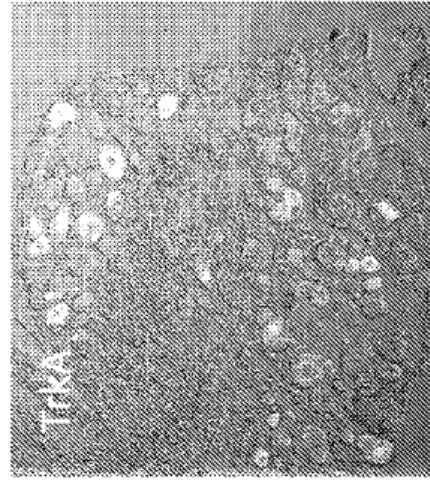
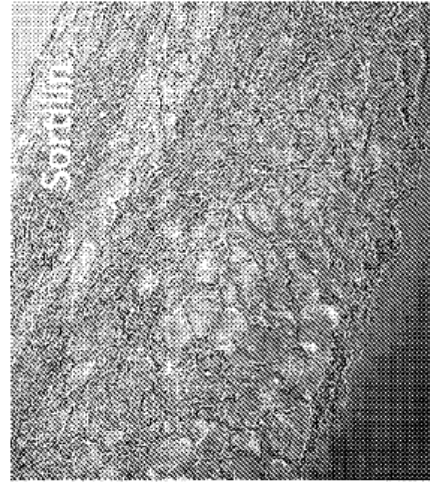
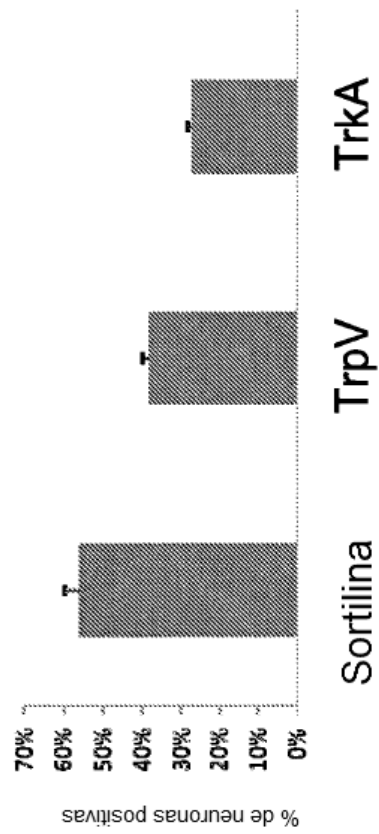


Fig. 4

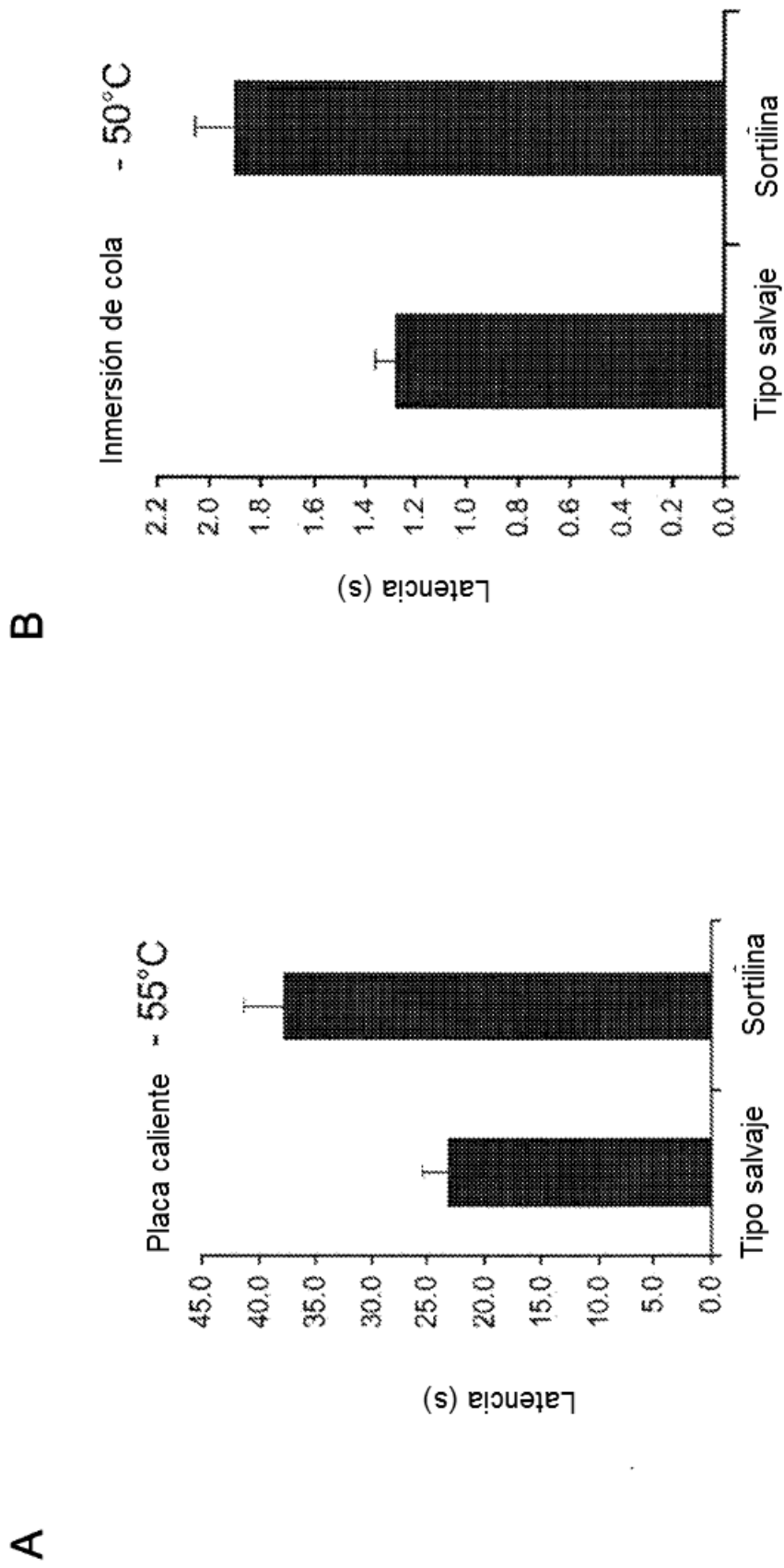
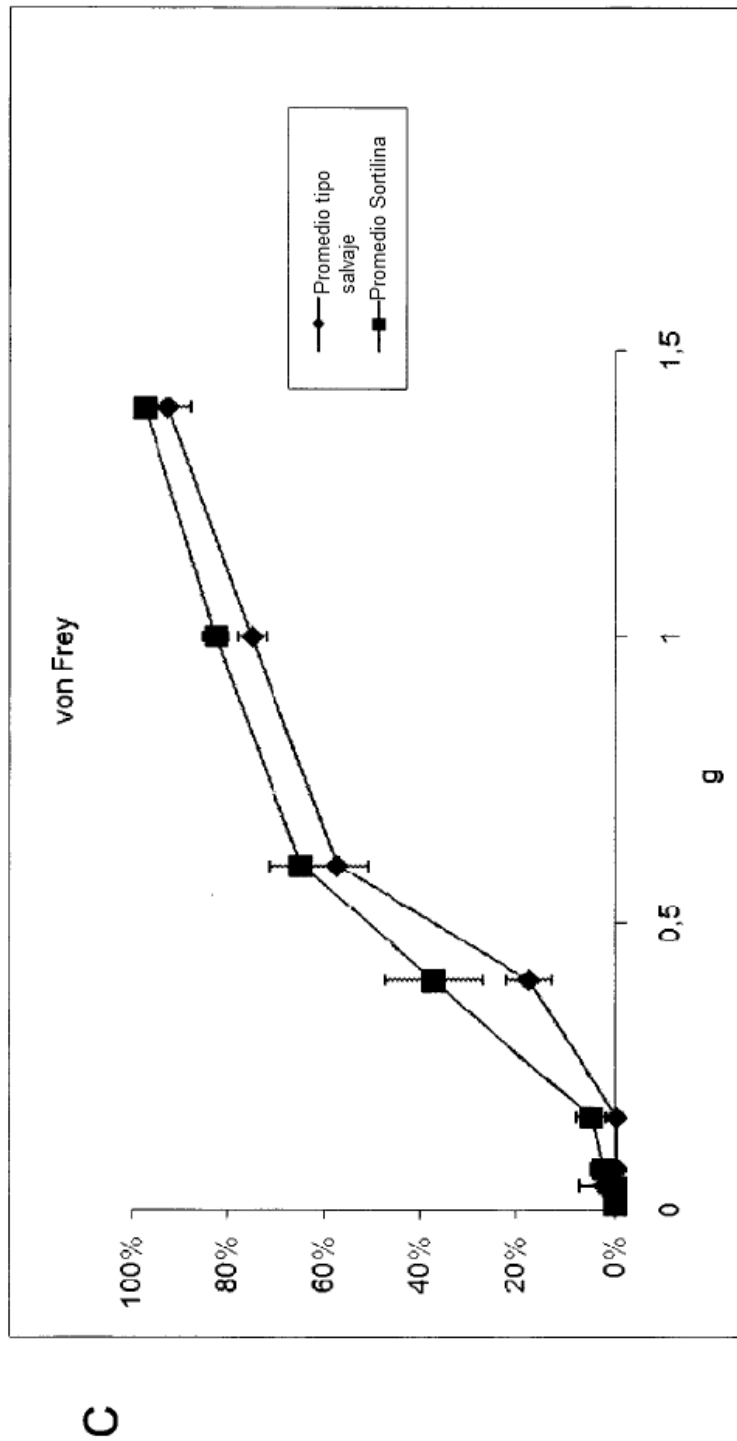


Fig. 5



0.16 0.4 0.6 1 1.4

Ensayo t 0.16 0.4 0.6 1 1.4  
 Tipo salvaje vs. Sortilina 0.1817 0.1492 0.4373 0.0981 0.4012

**Fig. 5 (Continuación)**

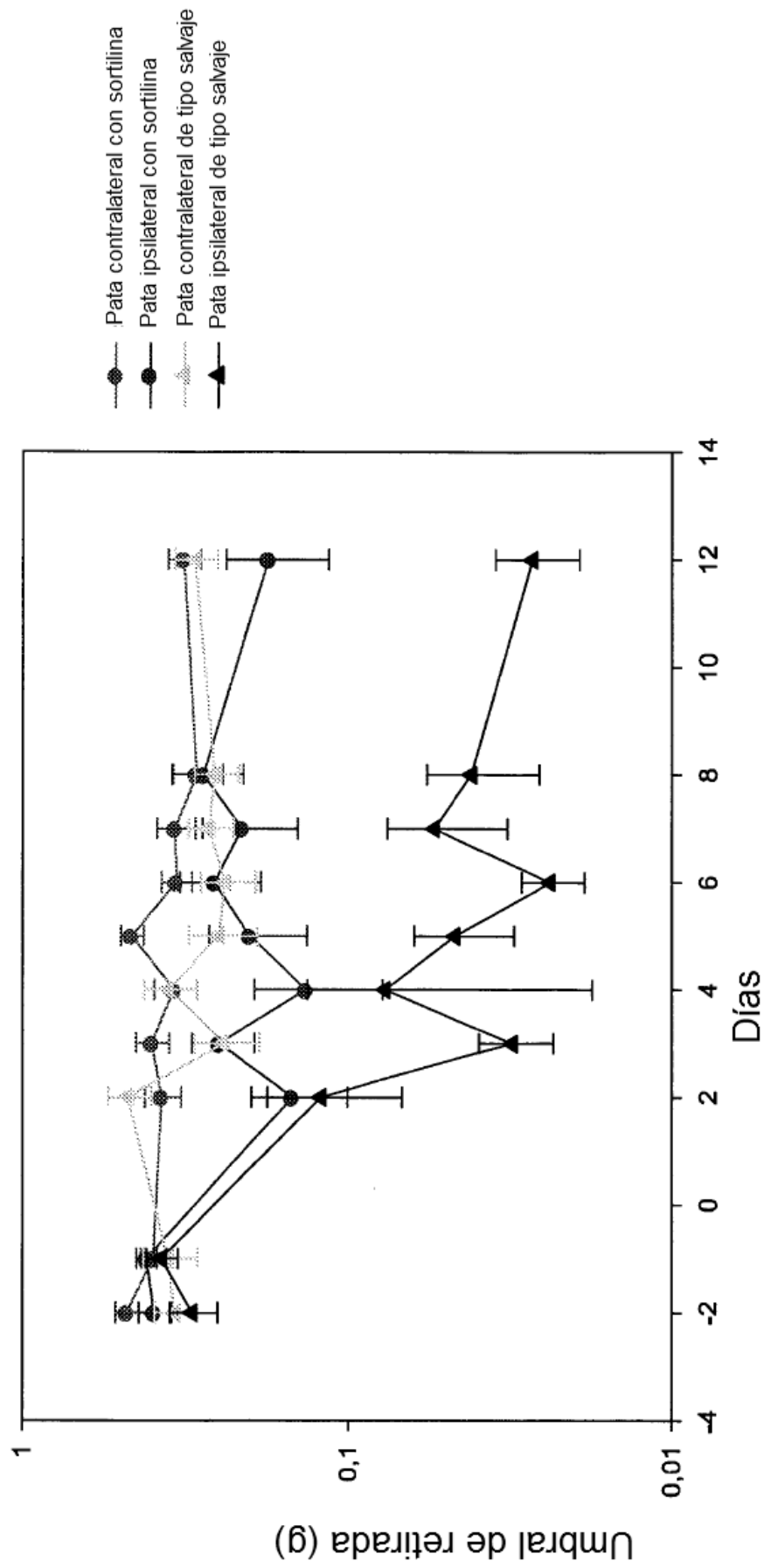


Fig. 6

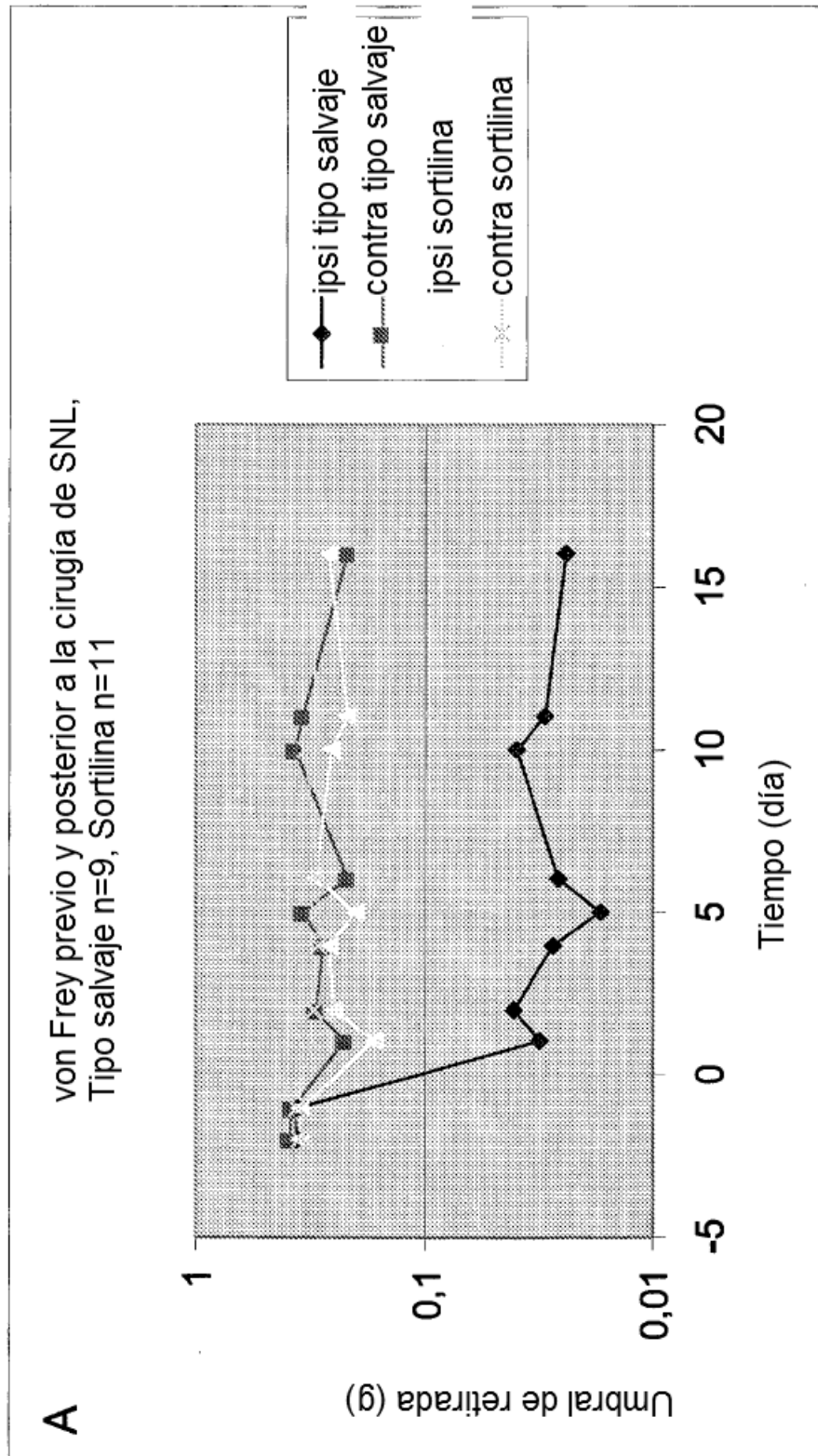


Fig. 7

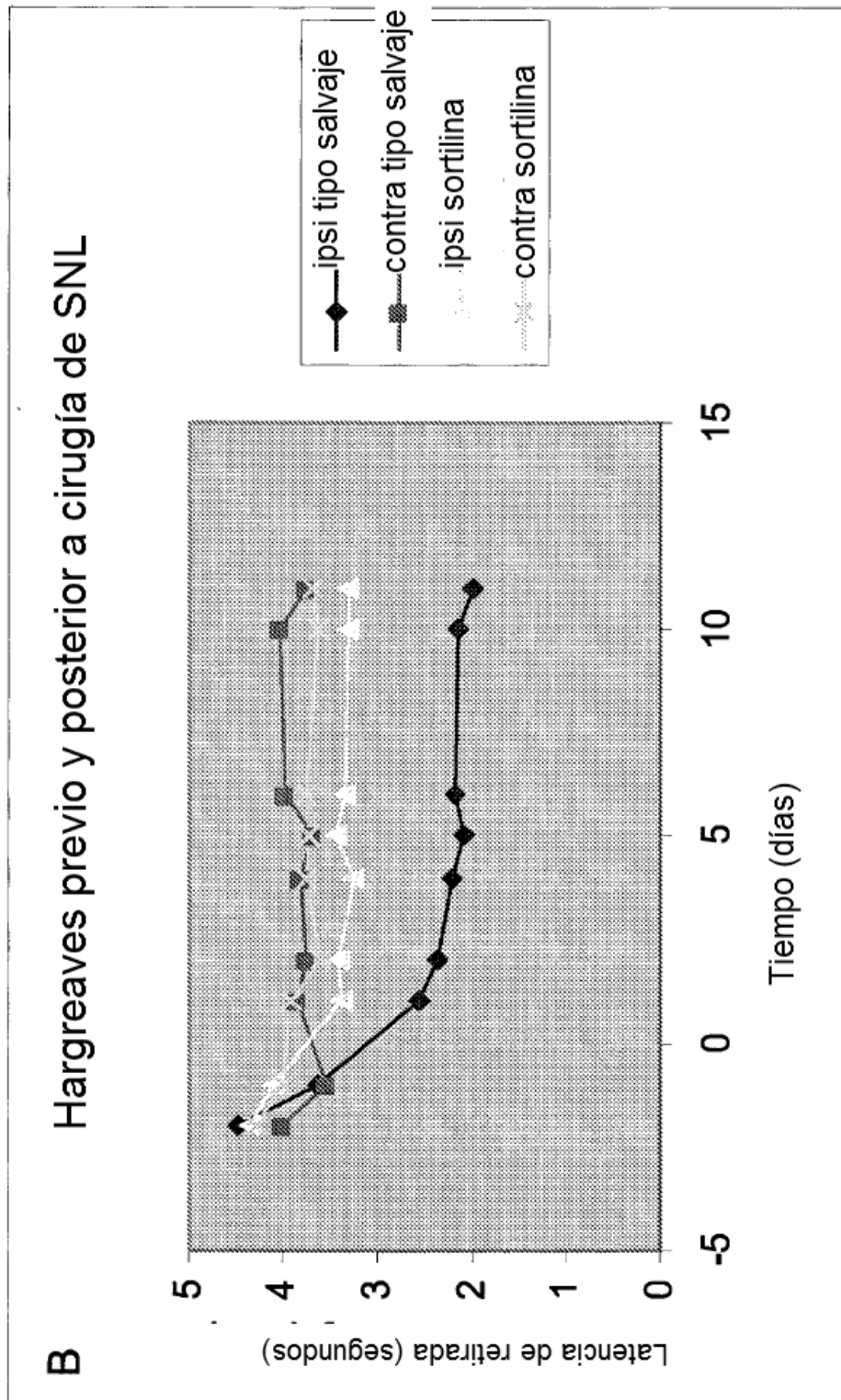
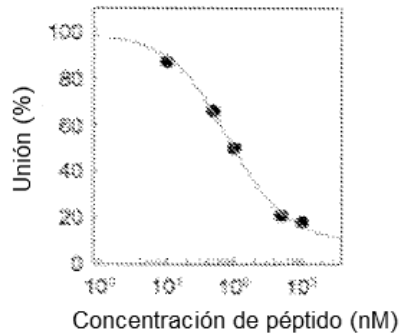


Fig. 7, (continuación)

Competencia por la unión a sSortilina inmovilizadas entre 100 nM GST etiquetado con YIL (GST-YIL) y los péptidos especificados

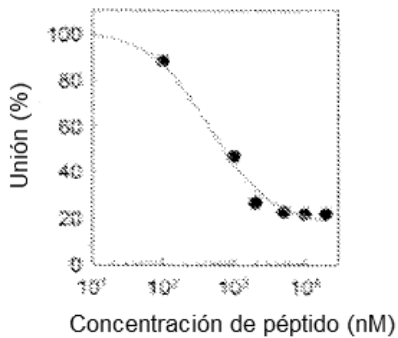
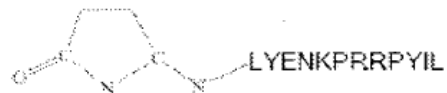


Péptido : NT

EC50: 81nM

Secuencia : pELYENKPRRPYIL

Estructura:

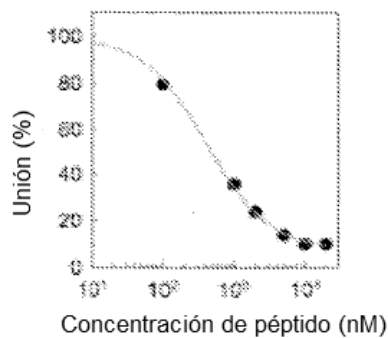


Péptido : NT8-13

EC50: 460nM

Secuencia : RRPYIL

Estructura:



Péptido : RRPYI(chg)

EC50: 420nM

Secuencia : RRPYI-ciclo-hexil-glicina

Estructura:

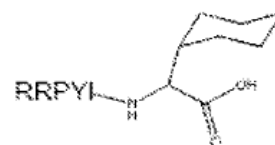
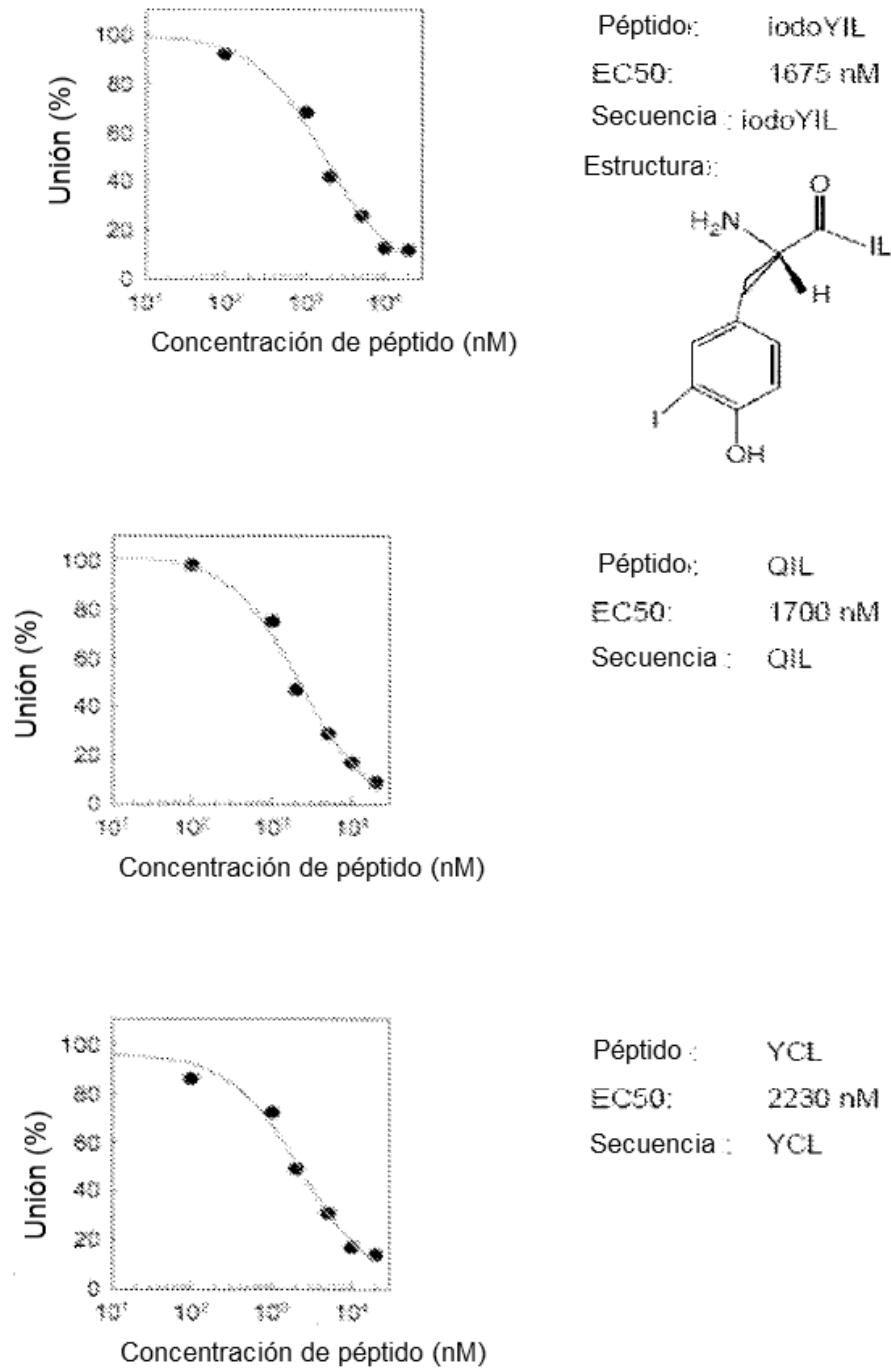


Fig. 8

Competencia por la unión a sSortilina inmovilizadas entre 100 nM GST etiquetado con YIL (GST-YIL) y los péptidos especificados



**Fig. 8, (continuación)**

Competencia por la unión a sSortilina inmovilizadas entre 100 nM GST etiquetado con YIL (GST-YIL) y los péptidos especificados

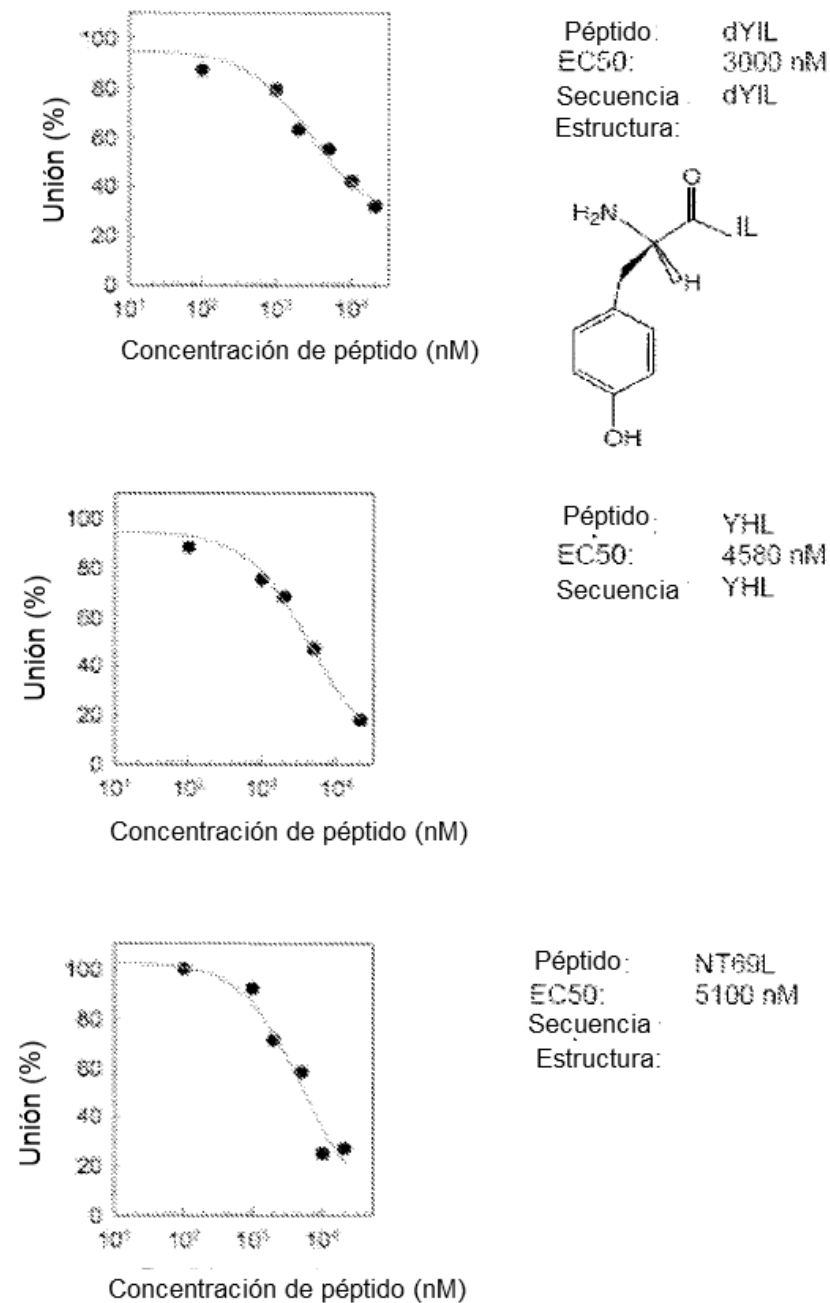


Fig. 8,(continuación)

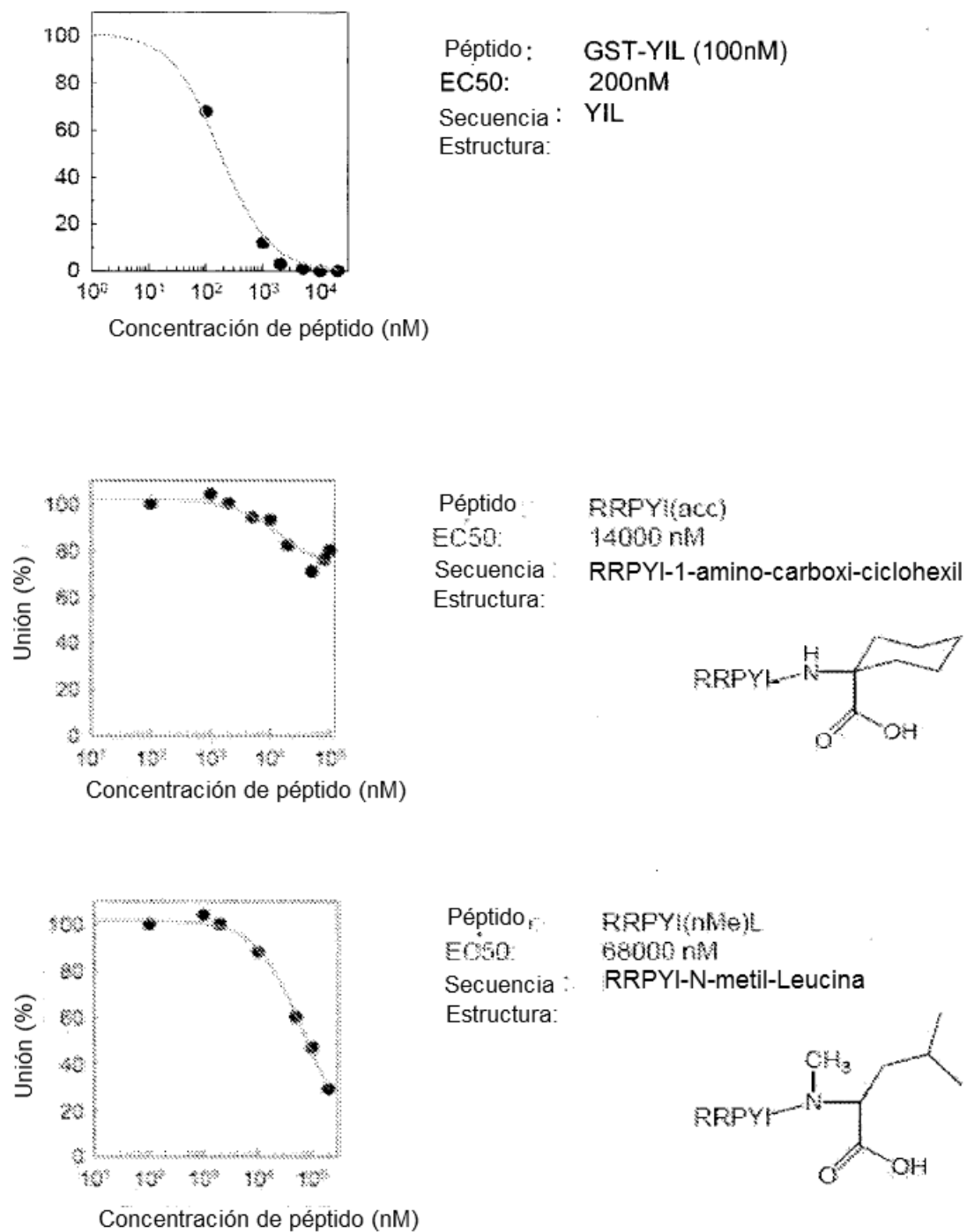


Fig. 8, (continuación)