



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 265 201**

⑫ Número de solicitud: 200301768

⑤① Int. Cl.:
C07K 14/705 (2006.01)
C07K 14/435 (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫② Fecha de presentación: **25.07.2003**

⑫③ Fecha de publicación de la solicitud: **01.02.2007**

Fecha de la concesión: **23.11.2007**

⑫⑤ Fecha de anuncio de la concesión: **01.01.2008**

⑫⑤ Fecha de publicación del folleto de la patente:
01.01.2008

⑦③ Titular/es: **Universidad Miguel Hernández**
Avenida del Ferrocarril, s/n
03202 Elche, Alicante, ES

⑦② Inventor/es: **Morenilla Palao, María Cruz;**
Planells Cases, Rosa María;
García Sanz, Nuria y
Ferrer Montiel, Antonio Vicente

⑦④ Agente: **Dávila Baz, Ángel**

⑤④ Título: **Nuevas dianas terapéuticas y su uso para el tratamiento del dolor.**

⑤⑦ Resumen:

Nuevas dianas terapéuticas y su uso para el tratamiento del dolor. Complejos macromoleculares implicados en la etiología del dolor, caracterizados por estar formados por la interacción de las proteínas vesiculares snapin y/o cualquiera de las isoformas de sinaptotagmina I, II o IX con el termorreceptor TRPV1, y su uso como dianas terapéuticas para el cribado de quimiotecas naturales o sintéticas y para la identificación de compuestos con actividad analgésica y/o antiinflamatoria.

ES 2 265 201 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Nuevas dianas terapéuticas y su uso para el tratamiento del dolor.

5 La presente invención se encuadra dentro del campo técnico de la genómica funcional y proteómica. Y en concreto se refiere a nuevos complejos formados por las proteínas sinaptotagmina y/o snapin con el receptor TRPV1, y su utilización como dianas terapéuticas para identificar compuestos analgésicos y/o antiinflamatorios para el tratamiento del dolor.

10 Estado de la técnica

El dolor representa un grave problema social y económico. Se calcula que más de 2 millones de personas están incapacitadas diariamente por sufrir sensaciones dolorosas transitorias o crónicas (*Williams, M, Kowaluk, E.A. and Arneric S.P (1999) Emerging Molecular approaches to pain therapy. J. Med. Chem. 42, 1481-1500*). Claros ejemplos lo representan la algesia experimentada por pacientes de cáncer, jaqueca, artritis, quemados, accidentados y los operados quirúrgicamente. A pesar de la gravedad del problema, el arsenal farmacéutico para combatirlo, prevenirlo y/o aminorar su sintomatología y su progreso es sorprendentemente limitado, debido, en parte, a la falta de dianas terapéuticas específicas sobre las que actuar, y al desconocimiento de las rutas metabólicas que median la transducción del dolor.

20 Una de las propiedades más características de los procesos dolorosos es la hipersensibilidad mostrada a estímulos externos. Estos fenómenos se conocen como hiperalgesia y alodinia. El primero de ellos se refiere a una respuesta exagerada a un estímulo modestamente nocivo (por ejemplo: temperaturas templadas de 35-40°C). El término alodinia describe el fenómeno en que se perciben como dolorosos estímulos que no son nocivos (por ejemplo: una ligera brisa). Estos fenómenos surgen cuando existe un daño en un tejido (daño tisular) o en un nervio (trauma nervioso) y son consecuencia de una actividad nerviosa amplificada de los nervios que transmiten estímulos sensoriales. La amplificación en la actividad es debida a un incremento tanto en la frecuencia y magnitud de las señales nerviosas, como en el umbral de respuesta de las células nerviosas.

La sensación de dolor se inicia cuando las terminales periféricas de un grupo de neuronas sensoriales, conocidas como neuronas nociceptoras o nociceptores, se activan por estímulos nocivos de naturaleza química, mecánica o térmica (*"Williams, M, Kowaluk, E.A. and Arneric S.P (1999) Emerging Molecular approaches to pain therapy. J. Med. Chem. 42, 1481-1500"*, *"Baranauskas, G. and Nistri, A. (1998) Sensitization of pain pathways in the spinal cord: cellular mechanisms. Prog. Neurobiol. 54, 349-365"*, *"Belmonte, C. y Cerveró, F. Eds. (1996) Neurobiology of Nociceptors. Oxford University Press."*).

35 Las neuronas nociceptoras transmiten la información acerca del daño tisular a los centros procesadores de la sensación de dolor en la médula espinal y el cerebro. Además de producir señales eléctricas en las neuronas nociceptivas primarias, la lesión tisular desencadena una serie de procesos inflamatorios locales a los que se suman las propias terminaciones nociceptivas que, como consecuencia de su activación eléctrica, liberan neuropéptidos que potencian la inflamación local (inflamación neurogénica) y modifican la excitabilidad nociceptiva (sensibilización inflamatoria) provocando cambios profundos en la percepción de los estímulos aplicados en la zona dañada (hiperalgesia y alodinia), de tal forma que estímulos no nocivos son percibidos como dolorosos (*"Williams, M, Kowaluk, E.A. and Arneric S.P (1999) Emerging Molecular approaches to pain therapy. J. Med. Chem. 42, 1481-1500"*, *"Baranauskas, G. and Nistri, A. (1998) Sensitization of pain pathways in the spinal cord: cellular mechanisms. Prog. Neurobiol. 54, 349-365"*, *"Belmonte, C. y Cerveró, F. Eds. (1996) Neurobiology of Nociceptors. Oxford University Press."*).

Las bases moleculares y celulares de la transducción nociceptiva todavía son ignotas debido, fundamentalmente, al desconocimiento de la identidad molecular de muchos de los receptores implicados, así como a la indefinición de las rutas de señalización nociceptiva. En este sentido, no están claros los mecanismos de transducción de los estímulos químicos y térmicos (*"Szallasi, A. And Blumberg P.M. (1999) Vanilloid (capsaicin) receptors and mechanisms. Pharmacol. Rev. 51, 159-211"*, *"Cesare, P., Moriondo, A., Vellani, V, McNaughton, P.A. (1999) Ion channels gated by heat. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 7658-7663"*).

Se ha descrito la identificación y donación de un receptor de membrana activado por la capsaicina y calor (conocido como TRPV1) y sensibilizado por mediadores de la inflamación (*"Caterina, M. J., Schumacher, M.A., Tominaga, M., Rossen, T.A., Levine, J.D. and Julius, D. (1997) The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. Nature 389, 816-824"*, *"Caterina, M C. and Julius, D. (2001) The vanilloid receptor: A molecular gateway to the pain pathway. Annu. Rev. Neurosci. 24, 487-517."*). El TRPV1 es un receptor de la familia de los TRP que posee una selectividad a cationes, caracterizada por tener una alta permeabilidad a Ca^{2+} (*"Caterina, M C. and Julius, D. (2001) The vanilloid receptor: A molecular gateway to the pain pathway. Annu. Rev. Neurosci. 24, 487-517"*, *"Clapham, D.E., Runnels, L. W. and Strubing, C. (2001). The TRP ion channel family. Nat. Rev. Neurosci. 2, 387-396"*). Las propiedades de permeación del receptor TRPV1 son consistentes con la neurodegeneración observada por la activación térmica y/o química prolongada de los nociceptores en condiciones de dolor crónico (*"Belmonte, C. y Cerveró, F. Eds. (1996) Neurobiology of Nociceptors. Oxford University Press"*, *"Szallasi, A. and Blumberg, P.M. (1996) Vanilloid receptors: new insights enhance potential as therapeutic target. Pain 68, 195-208"*). El papel central de TRPV1 en la transducción de los estímulos químicos y térmicos sugiere que es una diana terapéutica para el tratamiento del dolor (*"Williams, M, Kowaluk, E.A. and Arneric S.P (1999) Emerging Molecular approaches to pain therapy. J. Med. Chem. 42, 1481-1500"*, *"Szallasi, A. And Blumberg P.M. (1999) Vanilloid (capsaicin) receptors and*

mechanisms. *Pharmacol. Rev.* 51, 159-211.”, “Szallasi, A. and Blumberg, P.M. (1996) Vanilloid receptors: new insights enhance potential as therapeutic target. *Pain* 68, 195-208.”). Consistente con esta hipótesis, la supresión genética o farmacológica de TRPV1 produce alteraciones en la nocicepción y, sobretudo, reduce notablemente la hiperalgesia térmica (“Caterina, M.J., Leffler, A., Malmberg, A.B., Martin, W.J., Trafton, J., Petersen-Zeit, K.R., Koltzenburg, M., Basbaum, A.I., and Julius, D. (2000) Impaired nociception and pain in mice lacking the capsaicin receptor. *Science* 288, 306-313”, “García-Martínez, C., Humet, M., Planells-Cases, R., Gomis, A., Caprini, M., Viana, F., De la Peña, E., Sanchez-Baeza, F., Carbonell, T., De Felipe, C., Pérez-Payá, E., Belmonte, C., Messegue, A. and Ferrer-Montiel, A. (2001) Attenuation of thermal nociception and hyperalgesia by novel TRPV1 blockers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 2374-2379”). Estas observaciones, junto con la existencia de terminaciones nociceptivas con umbrales de activación térmica diferentes, sugieren la existencia de una familia de receptores homólogos a TRPV1 o de complejos moleculares que interaccionan con el receptor y modulan su actividad (“Belmonte, C. y Cerveró, F. Eds. (1996) *Neurobiology of Nociceptors*. Oxford University Press.”, “Cesare, P., Moriondo, A., Vellani, V., McNaughton, P.A. (1999) Ion channels gated by heat. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 7658-7663”). Aunque la mayoría de estos componentes moleculares permanece todavía anónima, la clonación y caracterización de un receptor activado por calor de alto umbral (TRPV2) y otro de bajo umbral (TRPV3), apoya la hipótesis anterior con respecto a la existencia de receptores homólogos a TRPV1 (“Caterina, M.J., Rosen, T.A., Tominaga, M., Brake, A.J. and Julius, D. (1999). A capsaicin receptor homolog with a high threshold for noxious heat. *Nature* 398, 436-441”, “Smith, G.D., Gunthorpe, M.J., Kelsell, R.E., Hayes, P.D., Reilly, P., Facer, P., Wright, J.E., Jerman, J.C., Walhin, J-P., Ooi, L., Egerton, J., Charles, K.J., Smart, D., Randall, A.D., Anand, P. and Davis, J.B. (2002) TRPV3 is a temperature-sensitive vanilloid receptor-like protein. *Nature* 418, 186-190.”).

Además del papel que juega el receptor TRPV1 en la nocicepción térmica, se ha propuesto que este canal iónico también está implicado en la etiología del dolor de carácter inflamatorio (“Williams, M., Kowaluk, E.A. and Arneric S.P. (1999) Emerging Molecular approaches to pain therapy. *J. Med. Chem.* 42, 1481-1500”, “Szallasi, A. And Blumberg P.M. (1999) Vanilloid (capsaicin) receptors and mechanisms. *Pharmacol. Rev.* 51, 159-211.”). El dolor inflamatorio está mediado por la liberación de sustancias pro-algésicas como protones, histamina, citoquinas, prostaglandinas, ATP y NGF que sensibilizan a los nociceptores (“Belmonte, C. y Cerveró, F. Eds. (1996) *Neurobiology of Nociceptors*. Oxford University Press.”, “Szallasi, A. And Blumberg P.M. (1999) Vanilloid (capsaicin) receptors and mechanisms. *Pharmacol. Rev.* 51, 159-211.”). El proceso de la sensibilización inflamatoria se caracteriza por un incremento de la excitabilidad de los nociceptores debido a una disminución del umbral de disparo y a un incremento de la intensidad de la respuesta a estímulos externos físicos y/o químicos. Se ha sugerido que los mediadores de la inflamación activan cascadas de señalización intracelular que, en último término, modulan la excitabilidad de los receptores de membrana como TRPV1 (“Szallasi, A. And Blumberg P.M. (1999) Vanilloid (capsaicin) receptors and mechanisms. *Pharmacol. Rev.* 51, 159-211”, “Shinn J, Cho, H., Hwang, S. W, Jung, J, Shin, Y. C, Lee, S.-Y., Kim, S.H., Lee, M.G., Choi, H.Y., Kim, J., Haber, N.A., Reichling, D.B., Khasar, S., Levine, J.D., and Oh, U (2002) Bradykinin-12-lipoxygenase-VR1 signaling pathway for inflammatory hyperalgesia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99, 10150-10155”, “Hwang, S. W, Cho, H., Kwak, J., Lee, S.Y., Kang, C.J., Jung, J., Cho, S., Min, K.H., Suh, Y.G., Kim, D. And Oh U (2000) Direct activation of capsaicin receptors by products of lipoxygenases: endogenous capsaicin-like substances. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 6155-6160.”, “Obreja, O., Rathee, P.K., Lips, K.S., Distler, C. and Kress, M (2002) IL-1b potentiates heat-activated currents in rat sensory neurons: involvement of IL-1RI, tyrosine kinase, and protein kinase C. *FASEB J.* 16, 1497-1503”). Por ejemplo, se sospecha que la hiperalgesia térmica provocada por sustancias pro-algésicas como las citoquinas y las prostaglandinas es debida a la activación de las proteínas quinasa PKC y PKA que fosforilan al receptor TRPV1 modulando su actividad (“Szallasi, A. And Blumberg P.M. (1999) Vanilloid (capsaicin) receptors and mechanisms. *Pharmacol. Rev.* 51, 159-211.”, “Olah, Z., Karai, L and Iadarola, M.J. (2002) Protein kinase Ca is required for vanilloid receptor1 activation. *J. Biol. Chem.* 277, 35752-35759”, “Lopshire, J.C. and Nicol, G.D. (1998) The cAMP transduction cascade mediates the prostaglandine E₂ enhancement of the capsaicin-elicited current in rat sensory neurons: whole-cell and single-channel studies. *J. Neurosci.* 18, 6081-6092”). Así, se ha descrito que la fosforilación de TRPV1 por PKA disminuye la desensibilización del receptor inducida por capsaicina, aumentando, consecuentemente, su actividad iónica (Bhave, G., Zhu, W, Wang, H., Brasier, D.J., Oxford, G.S. and Gereau IV, R.W. (2002) cAMP-dependent protein kinase regulates desensitisation of the capsaicin receptor VR1 by direct phosphorylation. *Neuron* 35, 721-731.). Por otro lado, la activación de las rutas de señalización que implican PKC parece reducir la inhibición funcional del TRPV1 por PtdIns(4,5)-P₂ (Chung, H.-h., Prescott, E.D., Kong, H., Shields, S., Jordt, S.-E., Basbaum, A.I., Chao, M.W. and Julius, D. (2001) Bradykinin and nerve growth factor release the capsaicin receptor from PtdIns(4,5)P₂-mediated inhibition. *Nature* 411, 957-962.). Claramente, la información acumulada comienza a delinear las vías de señalización implicadas, aunque todavía no es suficiente para establecer el mecanismo molecular implicado en la etiología de la sensibilización inflamatoria de los nociceptores. Así, por ejemplo, las alteraciones funcionales provocadas por activación de la PKA y la PKC podrían deberse a un efecto directo sobre TRPV1, o un efecto sobre los agregados moleculares en los que participa el receptor. No pueden descartarse tampoco alteraciones en la biogénesis del receptor. En apoyo de esta sugerencia, se ha observado un incremento notable en la traducción del receptor TRPV1 en modelos animales de dolor inflamatorio crónico como el provocado por la administración del adyuvante completo de Freund (Ji, R.R., Samad, T.A., Jin, S-X., Schmoll, R. and Woolf, C.J. (2002) p38 MAPK activation by NGF in primary sensory neurons after inflammation increases TRPV1 levels and maintains hyperalgesia. *Neuron* 36, 57-68.). De lo expuesto se deduce que los mecanismos moleculares implicados en la sensibilización de los nociceptores en respuesta a la inflamación neurogénica son todavía una laguna importante de nuestro conocimiento.

El abordaje de todas estas incógnitas, es ahora posible gracias al desarrollo de distintas estrategias dentro del campo de la genómica funcional. Esta estrategia permite destapar, por una parte, interacciones proteína-proteína que conducen a la identificación y caracterización de complejos (macro)moleculares esenciales para la función biológica

y, por otra, exponen los cambios en los perfiles de expresión génica (transcriptoma) en respuesta a un estímulo nocivo. Indudablemente, la comprensión molecular de la nocicepción térmica y de la etiología del dolor inflamatorio es un paso fundamental para diseñar racionalmente mejores terapias analgésicas. La presente invención aporta una solución a este problema.

Resumen de la invención

Un primer aspecto de esta invención se refiere a complejos macromoleculares implicados en la etiología del dolor, caracterizados por estar formados por la interacción de las proteínas vesiculares snapin y/o cualquiera de las isoformas sinaptotagminas I, II o IX, con el termorreceptor TRPV1, preferentemente con su dominio N-terminal.

Un segundo objeto de la invención se refiere a aquellos complejos macromoleculares caracterizados porque se encuentran localizados en vesículas sinápticas neuronales y cuya función es transportar el TRPV1 a la superficie de células nerviosas mediante exocitosis regulada.

Un tercer aspecto de esta invención se refiere al uso de los complejos macromoleculares descritos anteriormente como dianas terapéuticas para el cribado de quimiotecas, y en concreto para buscar moduladores e inhibidores químicos para desarrollar nuevos compuestos y fármacos analgésicos y/o antiinflamatorios, para el tratamiento del dolor.

Descripción de la invención

La presente invención se basa en la identificación del complejo macromolecular formado por la interacción de cualquiera de las isoformas I, II o IX de la proteína vesicular sinaptotagmina y/o la proteína snapin con el tennoreceptor TRPV 1. Este receptor está implicado en la etiología del dolor y de la inflamación. La identificación del complejo formado se ha llevado a cabo mediante el establecimiento de una plataforma de genómica funcional y proteómica con el objetivo de identificar genes implicados en la transmisión de las sensaciones dolorosas y que, además estén implicados en la manifestación de la hiperalgesia y la alodinia. Funcionalmente, el complejo macromolecular formado sinaptotagmina y/o snapin con TRPV1 es crucial para transportar el termorreceptor a la superficie de las células nerviosas, especialmente en situaciones de dolor e inflamación. Este transporte se realiza mediante un mecanismo de exocitosis por el que el receptor almacenado en vesículas es movilizado a la superficie celular donde la vesícula que contiene el receptor TRPV1 se fusiona con la membrana celular. Por tanto, una consecuencia fundamental de la interrupción del proceso de movilización y/o de fusión es la menor incorporación de receptores a la superficie celular, lo que se traduce en una menor respuesta a estímulos nocivos externos, como por ejemplo, una menor sensación de dolor. El transporte del receptor a la superficie se inhibe al destruir los complejos moleculares implicados en la movilización, es decir, al romper las interacciones de sinaptotagmina y/o snapin con TRPV 1. En consecuencia, estas interacciones y los complejos que originan (sinaptotagmina-TRPV1, snapin-TRPV1, sinaptotagmina-snapin-TRPV1) son verdaderas dianas terapéuticas para la identificación de nuevos compuestos analgésicos y/o antiinflamatorios.

Dentro del ámbito de la presente invención se encuentra el uso de dichos complejos macromoleculares como dianas terapéuticas para la identificación de compuestos capaces de modular o inhibir la formación del complejo como potenciales fármacos analgésicos para el tratamiento de la patología del dolor. En un aspecto concreto, la presente invención incluye métodos de cribado y ensayo que permiten identificar compuestos que alteran la unión de las proteínas snapin y sinaptotagmina al receptor TRPV1. Dicha ruptura puede llevar a la inhibición de la fusión de vesículas conteniendo el receptor con la membrana celular, resultando en una disminución de la expresión superficial de TRPV1 y, en consecuencia, en una atenuación de la inflamación neurogénica y de la sensación de dolor.

Los métodos de cribado se pueden utilizar también para aislar compuestos de quimiotecas naturales o sintéticas de diversa complejidad estructural. Estos métodos pueden además adaptarse a formatos de alto rendimiento (high throughput screening assays, HTS) para acelerar el cribado de las quimiotecas e identificar compuestos activos.

Los métodos pueden requerir la producción y purificación de las proteínas mediante técnicas recombinantes o pueden requerir la purificación de las proteínas de fuentes celulares apropiadas o pueden usar las proteínas en su entorno natural. Las proteínas se pueden producir integras o, alternativamente, se pueden producir los dominios solubles (sin los segmentos transmembranales) o exclusivamente los dominios de interacción. Cualquiera de estas aproximaciones es útil para reconstituir *in vitro* los complejos macromoleculares y utilizar estos para descubrir agentes moduladores o inhibidores de la formación del complejo. Estos complejos se pueden formar preferentemente, aunque no restringido, con los ortólogos humanos de las proteínas.

Alternativamente, las proteínas snapin, sinaptotagmina y TRPV1, o cualquiera de sus dominios, se pueden expresar como proteínas de fusión en procariotas utilizando métodos convencionales como la fusión a la proteína glutatión S-transferasa (GST), a una cola de 4 o más residuos del amino ácido histidina (His), a la proteína de unión a maltosa (MBP), o cualquier proteína o péptido que se use para generar proteínas de fusión. Las proteínas snapin, sinaptotagmina y TRPV1, o cualquiera de sus dominios, se pueden fusionar al extremo amino o carboxilo de las proteínas o péptidos anteriores. La fusión se realiza uniendo los cDNAs que codifican a las proteínas en un vector plasmídico adecuado. Así, por ejemplo, los cDNAs que codifican las proteínas se pueden clonar en el vector pET-22b que contiene una secuencia de 6 residuos de His, o en el vector pGEX que contiene la proteína GST. Vectores similares existen para otras proteínas utilizadas en la producción de proteínas de fusión. A las proteínas de fusión se les puede añadir opcionalmente una secuencia de translocación al periplasma bacteriano.

La producción de proteínas de fusión contempla la expresión del vector con la fusión de la proteína-proteína o proteína-péptido en una cepa bacteria adecuada. Los vectores utilizados contienen además promotores inducibles que permiten iniciar la producción de proteína cuando se ha alcanzado un crecimiento bacteriano apropiado.

- 5 La producción se inicia normalmente mediante la adición de un nutriente como el isopropil- β -D-tiogalactopiranosido, un análogo de la galactosa.

Las proteínas de fusión se extraen del cultivo bacteriano bien del periplasma o del citosol de la bacteria. En el segundo caso, la bacteria se lisa con métodos convencionales como, por ejemplo, mediante tratamiento con la enzima
10 lisozima que degrada la pared bacteriana y ultrasonidos en presencia de detergentes. El extracto celular se centrifuga para eliminar restos sólidos, y el sobrenadante se utiliza para purificar la proteína de fusión mediante cromatografía de afinidad basada en el uso de un producto que se une a la proteína fusionada, por ejemplo, glutation para la GST, el catión Ni^{2+} o Co^{2+} o Zn^{2+} para 6xHis, u otras formas descritas. En el caso de que las proteínas se localicen como
15 agregados en los llamados cuerpos de inclusión, el procedimiento de purificación incluye etapas adicionales dirigidas a la purificación de dichos cuerpos mediante centrifugación diferencial, así como a su solubilización utilizando medios convencionales basados en detergentes o agentes caotrópicos como la urea y el cloruro de guanidinio. Las proteínas de fusión se purifican de los cuerpos de inclusión solubilizados mediante cromatografía de afinidad como se ha descrito anteriormente.

20 Las proteínas purificadas se pueden utilizar directamente como proteínas de fusión o bien se puede proceder a eliminar la proteína fusionada mediante tratamiento enzimático o químico. Convencionalmente, la unión de las proteínas o la proteína péptido se realiza mediante una secuencia peptídica que es reconocida específicamente por una proteasa (trombina, factor IX, etc) o por un puente disulfuro sensible a agentes reductores. Por ello, el tratamiento con estos agentes libera las proteínas de interés de la fusión. La separación y purificación final se puede realizar
25 mediante métodos cromatográficos convencionales (tamizado molecular, intercambio iónico, HPLC, FPLC, afinidad, hidrofobicidad).

Las proteínas implicadas en la formación del complejo macromolecular objeto de la invención también pueden producirse en células eucarióticas y purificarse a partir de estas. En este caso, se pueden utilizar, opcionalmente, líneas
30 celulares como las CHO, COS, HEK, PC12, neuroblastomas, etc. La purificación puede acometerse a partir de extractos celulares mediante cromatografía de afinidad utilizando anticuerpos específicos contra epítomos de las proteínas. Dichos epítomos pueden ser específicos de las propias proteínas o pueden haber sido incorporados a la misma mediante técnicas de biología molecular. Por ejemplo, se puede incorporar en el extremo amino o carboxilo de las proteínas una secuencia del factor de transcripción eucariota myc, o de la proteína del virus de la gripe HA. Existen anticuerpos
35 comerciales contra estas secuencias, así como contra otras, que son útiles para acometer la inmunopurificación de las proteínas de sistemas eucariotas. Del mismo modo, se puede utilizar una secuencia de 6xHis como en el caso de la expresión procariota.

Los métodos descritos para la producción y purificación de las proteínas que forman el complejo macromolecular
40 objeto de la invención son extensibles a la producción de los complejos formados por snapin con TRPV1 completo o su dominio N-terminal, y sinaptotagmina con TRPV1 completo o su dominio N-terminal o snapin y sinaptotagmina con TRPV1 completo o su dominio N-terminal. Los complejos pueden obtenerse directamente mediante la co-expresión de las proteínas respectivas en las mismas células procariotas o eucariotas.

Los métodos para seguir la formación de los complejos *in vitro* pueden ser bioquímicos, inmunológicos y/o es-
45 pectroscópicos. Un ejemplo de seguimiento de la formación del complejo mediante técnicas bioquímicas comporta la visualización mediante métodos de arrastre, utilizando una de las proteínas del complejo fusionada a otra proteína o péptido (GST, MBP, 6xHis). Una de las proteínas que forma parte del complejo se puede utilizar marcada radioactivamente, por ejemplo, con [^{35}S]Metionina u otro aminoácido radioactivo. La síntesis radioactiva puede realizarse en
50 células o en sistemas acoplados de transcripción y traducción *in vitro* (como los comercializados por Promega Corporation). Se ponen en contacto todas las proteínas en condiciones y tiempo apropiado y se procede a purificar el complejo mediante cromatografía de afinidad para la proteína de fusión. La co-purificación de ésta con la proteína radiactiva indica la formación de un complejo proteico. El análisis de la separación y análisis de las proteínas integrantes del complejo puede hacerse por cromatografía o electroforesis. La visualización en el segundo caso puede ser por tinción
55 con azul de comasie o plata, o por fluorografía si una de las proteínas estaba marcada radioactivamente, o por inmunoblot con un anticuerpo específico contra un epítipo natural o introducido por ingeniería genética en la proteína.

Un método alternativo considera el seguimiento de la formación del complejo *in vitro* mediante métodos inmunológicos, y se basa en la técnica del radioinmunoensayo (RIA) o de la enzima inmovilizada (ELISA) o de fluorescencia.
60 En estos ensayos se puede determinar la cantidad de complejo formado directamente o indirectamente (midiendo la cantidad de proteína libre). Los ensayos se pueden realizar en multiplacas (24, 96, 384 pocillos, etc). Una de las proteínas se inmoviliza en la placa y se añaden las otras proteínas para formar el complejo en las condiciones apropiadas. Tras el tiempo de incubación, se lava la placa con tampón isotónico para eliminar las proteínas no unidas, y se incuba con el anticuerpo primario adecuado, seguido de los lavados y, del segundo anticuerpo conjugado a una enzima (peroxidasa o fosfata alcalina) o a un compuesto radioactivo (^{125}I , etc) o a una sonda fluorescente (rodamina, fluoresceína, etc). En el caso de que el primer anticuerpo esté conjugado a cualquiera de las opciones, la incubación con el segundo anticuerpo se puede obviar.

El seguimiento de la formación del complejo *in vitro* también puede realizarse mediante métodos espectroscópicos y de fluorescencia. La formación de complejos también puede seguirse mediante la técnica de “surface plasmon resonance” ampliamente utilizada para determinar constantes de unión en la formación de complejos. Se pueden seguir cambios en las propiedades espectrales de las proteínas tras la formación del complejo, como por ejemplo, aunque
 5 no limitados a éstos, alteraciones en el espectro de absorción, o en el espectro de emisión. También pueden ocurrir cambios en la anisotropía o polarización de fluorescencia que mide la movilidad de fluoróforos en disolución. La formación de complejos comporta la formación de agregados moleculares de mayor peso y movilidad restringida. La anisotropía puede medirse directamente de las proteínas mediante la fluorescencia del aminoácido triptófano o en proteínas conjugadas químicamente a fluoróforos como por ejemplo, aunque no exclusivamente, la rodamina o la
 10 fluoresceína entre otros. También puede contemplarse el uso de las proteínas fusionadas a las proteína fluorescentes ciano (CFP), amarilla (YFP), verde (GFP), azul (BFP) y/o roja (RFP) (comercializadas por BD Biosciences Clontech). Estas proteínas de fusión se pueden producir y purificar como se ha descrito anteriormente.

Las proteínas fusionadas a proteínas fluorescentes y o conjugadas químicamente a moléculas fluorescentes pueden
 15 además utilizarse para realizar mediadas de resonancia de energía de transferencia de fluorescencia (conocida como FRET) que permite medir la interacción entre proteínas o moléculas, por cuanto la eficacia de este proceso depende de la inversa de la sexta potencia de la distancia entre dos moléculas fluorescentes, una que actúa como donador de energía y otra que es el aceptor de dicha energía.

En todos estos métodos, la formación del complejo puede realizarse en ausencia o presencia de agentes modula-
 20 dores naturales o sintéticos. Estos productos pueden administrarse previamente a la formación del complejo o sobre el complejo formado.

El grado de formación del complejo proteico en presencia de dichos compuestos es una medida de su eficacia
 25 inhibidora.

Los complejos proteicos pueden formarse *in vivo*, directamente en las células y seguirse fácilmente su modulación mediante la técnica del doble híbrido en levaduras. Para ello los dominios de interacción se clonan en vectores de expresión en levadura. Uno de los vectores contiene el dominio de unión del factor de transcripción Gal4 o Lex A, como por ejemplo el pPC97, y el otro el dominio de activación de dichos factores de transcripción, por ejemplo el pPC86, como se describe con detalle en “*The yeast two-hybrid system*, Ed. Paul L. Bartel and Stanley Fields, Oxford University Press, 1997”. Una de las proteínas integrantes del complejo se clona como proteína de fusión del dominio de unión del factor de transcripción y la otra como fusión de su dominio de activación. La reconstrucción del factor de transcripción por la interacción de las proteínas fusionadas conlleva a la transcripción de genes que permiten (selección
 35 directa) o inhiben (selección inversa) la supervivencia celular en condiciones restrictivas. El seguimiento fenotípico se realiza utilizando genes reporteros como crecimiento en ausencia de aminoácidos o de productos tóxicos como el ácido 5-fluororótico. Por ejemplo, la modulación o disrupción de complejos proteicos o interacciones proteína-proteína se puede seguir fácilmente, aunque no de forma exclusiva, con la metodología del doble híbrido inverso que mide la supervivencia celular cuando se rompe la interacción. En este caso, la formación del complejo proteico permite la transcripción que codifica a la orotidina-5'-fosfato descarboxilasa que cataliza la conversión del compuesto 5-fluoroorótico al metabolito tóxico 5-fluorouracilo, que resulta letal para las levaduras. Compuestos que prevengan la formación del complejo proteico snapin y/o sinaptotagmina con TRPV1, inhibirán la producción de la descarboxilasa y, consecuentemente, la producción del 5-fluorouracilo, permitiendo el crecimiento de las levaduras. Este ensayo puede, por tanto, utilizarse para identificar eficazmente compuestos moduladores o inhibidores de los complejos objeto
 40 de esta invención.

Un ensayo similar puede desarrollarse con el doble híbrido en levaduras directo. En este caso la disrupción o desestabilización del complejo proteico conduciría a una inhibición del crecimiento celular (*The yeast two-hybrid system*, Ed. Paul L. Bartel and Stanley Fields, Oxford University Press, 1997).
 50

Diversos ensayos pueden establecerse en células eucariotas para seguir la formación del complejo y modular su ensamblaje, estabilidad y/o funcionalidad. Los cDNAs que codifican las proteínas se pueden clonar en vectores de expresión eucariota apropiados y se pueden transfectar mediante técnicas convencionales como electroporación, fosfato cálcico, lipofectamina, etc. La expresión puede ser transitoria, estable o inducible (*Short Protocols in Molecular Biology*, 4th edition, Ed. Ausubel et al. John Wiley & Sons, 1999).
 55

La formación de los complejos en células eucariotas se puede seguir mediante la técnica de FRET. Una de las proteínas se fusiona a la proteína fluorescente ciano (CFP) y la otra a la proteína fluorescente amarilla (YFP). La CFP actúa como donadora de energía de fluorescencia y la YFP como aceptor de la misma. El registro de la eficacia del proceso de FRET en un espectrofluorímetro o en microscopio de fluorescencia o en un lector de multi-placas como el FLIPR o similar, permite seguir la formación del complejo proteico. De este modo, el efecto de los compuestos moduladores o inhibidores se puede realizar fácilmente monitorizando los cambios en la eficacia de FRET.
 60

Como ensayo funcional se puede utilizar la potenciación de la actividad del receptor TRPV1 inducida por activa-
 65 dores de vía de señalización de la PKC como, por ejemplo, los esteres de forbol y los mediadores de la inflamación. Estos compuestos aumentan la actividad del receptor TRPV1 incrementado su expresión superficial mediante fusión vesicular. Compuestos que rompan las interacciones de TRPV1 con snapin y/o sinaptotagmina bloquearan la incorporación de receptores a la membrana celular y, consiguientemente, inhibirán la estimulación de TRPV1 mediada por

activación de la PKC. Métodos apropiados para seguir el efecto de agentes sobre este proceso son la biotilización de proteínas superficiales y separación mediante cromatografía de afinidad con avidina y análisis mediante electroforesis e inmunoblot con anticuerpos específicos; registro funcional de la actividad de canal iónico mediante técnicas electrofisiológicas o de flujos de Ca^{2+} con sondas fluorescentes; o, registro del incremento en el área de la membrana mediante medida electrónica de la capacitancia celular.

Por tanto, los complejos identificados están implicados en la etiología del dolor, y su modulación con moléculas sintéticas o naturales puede originar nuevos analgésicos y/o antiinflamatorios para el tratamiento del dolor.

Los compuestos identificados en los ensayos de inhibición o modulación de la formación de los complejos macromoleculares objeto de la presente invención son candidatos a su desarrollo como agentes terapéuticos para el tratamiento de condiciones inflamatorias asociadas en parte con la actividad de TRPV1 (por ejemplo, psoriasis o enfermedades respiratorias como asma, entre otras), artritis (por ejemplo, osteoartritis o artritis reumatoide entre otras) y para su uso como analgésicos. Dichos compuestos pueden tener distintas características físico-químicas, aunque típicamente son compuestos orgánicos, preferentemente moléculas orgánicas pequeñas con un peso molecular entre 50 y 2500 daltons. Dichos compuestos contienen grupos funcionales necesarios para su interacción estructural con las proteínas que forman los complejos macromoleculares objeto de la presente invención, particularmente puentes de hidrógeno, y típicamente incluyen como mínimo un grupo amino, carbonilo, hidróxilo o carboxilo, preferentemente como mínimo dos de estos grupos funcionales. Alternativamente, dichos compuestos pueden ser una biomolécula, como por ejemplo un péptido, proteína, azúcar, ácido graso, esteroide, purina, pirimidina, o sus derivados o análogos estructurales entre otros.

Los compuestos identificados en los ensayos de inhibición o modulación de la formación de los complejos macromoleculares objeto de la presente invención pueden obtenerse de distintas fuentes, incluyendo quimiotecas de compuestos sintéticos o naturales. Por ejemplo, hay distintos métodos asequibles en el estado de la técnica de síntesis dirigida o al azar de una amplia variedad de compuestos orgánicos y biomoléculas, incluyendo la expresión de oligonucleótidos y péptidos.

Alternativamente, las quimiotecas de productos naturales pueden aislarse de extractos de bacterias, hongos, vegetales o animales (incluyendo extractos de tejidos humanos para identificar factores endógenos que afecten la actividad de TRPV1).

Adicionalmente, los compuestos, bien tengan su origen en quimiotecas sintéticas o de productos naturales, pueden modificarse mediante métodos convencionales químicos (como por ejemplo, acilación, alquilación, esterificación y amidación entre otros), físicos o bioquímicos, para producir nuevos compuestos con capacidad moduladora o inhibidora de la formación de los complejos macromoleculares de la presente invención.

Realización de la invención

Ensayo 1

Interacción in vitro del dominio N-terminal del receptor TRPV1 con las proteínas snapin y sinaptotagmina

Se utilizó el dominio N-terminal del termorreceptor TRPV1 (aa 1-423, SEQ. N° 1) como cepo para rastrear una genoteca de cDNAs (presa) originaria de cerebro de rata, mediante la técnica del doble híbrido en levaduras, con el objetivo de identificar componentes moleculares de los complejos que median la transducción sensorial a través del receptor TRPV1 (SEQ. N° 2).

Tanto el cepo como la genoteca estaban clonados como proteínas de fusión de los dominios de activación y unión del factor de transcripción Gal4 de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Dado que las cepas de levadura utilizadas eran deficientes para *HIS*, *LEU*, *ADE* y *TRP*, la interacción entre proteínas se detectó mediante activación génica de estos genes reporteros en un medio restringido como SD/-His/-Leu/-Trp/-Ade, en presencia de 20 mM 3-amino-1,2,4 triazolol (3-AT). El 3-AT se utilizó para inhibir la expresión basal del gen *HIS* ya que puede llevar a la aparición de falsos positivos. Para facilitar la detección de la interacción, también se utilizó la activación del gen reportero MEL1 que permite la metabolización de X- α -Gal dando un producto de color azul. Las colonias positivas se re-estiraron y el inserto se analizó por PCR utilizando cebadores específicos de los extremos 5' y 3' de la construcción. Los clones seleccionados se secuenciaron para identificar el producto génico que contenían.

El rastreo de la genoteca identificó como proteínas que interaccionan con el dominio N-terminal de TRPV1, las proteínas snapin (SEQ. N° 3) y sinaptotagmina (isoforma IX, también conocida anteriormente como V, SEQ. N° 4).

Para corroborar este resultado se evaluó el crecimiento de las levaduras expresando el dominio N-terminal del receptor TRPV1 y snapin o sinaptotagmina IX. Como se observa en la Figura 1, las levaduras expresando el N-terminal de TRPV1 y snapin o el N-terminal de TRPV1 y sinaptotagmina IX crecieron en el medio restrictivo en presencia de 3-AT a 20 mM y fueron capaces de metabolizar el X- α -Gal originando la coloración azul. Por el contrario, la expresión del dominio N-terminal de TRPV1 solo produjo un crecimiento basal de las levaduras.

Figura 1A. Representación esquemática de una subunidad molecular que compone el receptor TRPV 1. Se muestran los segmentos transmembrana (cilindros), el dominio C-terminal, y el dominio N-terminal. En este último se resaltan los tres dominios de ankirina (óvalos). Debajo hay una ampliación del dominio N-terminal (aminoácidos 1-414). En el interior se muestran los dominios de ankirina.

Figura 1B. Fotografía mostrando el crecimiento de levaduras co-expresando el dominio N-terminal del receptor TRPV1 y snapin (N-TRPV1/snapin), el N-terminal del receptor TRPV1 y sinaptotagmina IX (N-TRPV1/SYT IX), el N-terminal de TRPV1 solo. El color azul indica crecimiento intenso (Ref. 1).

Para comprobar la veracidad y fortaleza de la interacción entre el N-terminal de TRPV1 y las proteínas identificadas, se realizaron ensayos de “arrastre” *in vitro*, incubando el dominio del receptor recombinante y las proteínas traducidas *in vitro* y marcadas con [³⁵S-Met]. Los complejos se separaron mediante cromatografía de afinidad en columnas de Ni-NTA aprovechando que el dominio N-terminal recombinante posee una secuencia de 6 x His. La presencia de las proteínas snapin y sinaptotagmina se detectó mediante análisis de electroforesis en geles de SDS-PAGE y fluorimetría. Los resultados revelaron que ambas proteínas interaccionaron fuertemente con el dominio N-terminal de TRPV1.

En la figura 2, se ilustra la interacción del dominio N-terminal de TRPV1 con la proteína sinaptotagmina IX, así como con la isoforma I, una isoforma evolutivamente cercana a sinaptotagmina IX (*Südhof T.C (2002) Synaptotagmins: why so many? J.Biol. Chem. 277, 7629-7632*). También se muestra que las zonas de interacción son, principalmente, en el dominio de ankirinas del N-terminal de TRPV1 y el dominio de unión de calcio C2A de la sinaptotagmina.

Esta interacción fue destruida por péptidos que imitan la superficie de interacción. Así la preincubación del dominio N-terminal de TRPV1 con un péptido que reproducía la secuencia del dominio C2A de sinaptotagmina IX (SEQ. N° 5), inhibió la interacción de la sinaptotagmina con el segmento amino terminal de TRPV1.

El mapeo del sitio de unión en el dominio N-TRPV1 reveló que las proteínas interaccionan preferentemente con el dominio de ankirinas (aminoácidos 198 a 388) presente en el extremo N-terminal de TRPV 1. Del mismo modo, se determinó que la interacción con sinaptotagmina se realiza, preferentemente, por el dominio de unión a calcio C2A.

Figura 2A. Formación de complejos *in vitro* entre la sinaptotagmina IX y I sintetizadas *in vitro* y marcadas radioactivamente ([³⁵S]Met), con el dominio N-terminal de TRPV1 (N-TRPV1-His) y proteínas truncadas del mismo.

Figura 2B. Formación de complejos *in vitro* entre el dominio N-terminal de TRPV1 y la proteína sinaptotagmina completa y especies truncadas.

Figura 2C. Ruptura del complejo entre el dominio N-terminal de TRPV1 y la sinaptotagmina por un péptido que imita la secuencia de aminoácidos del dominio de unión de calcio C2A. NGR1 indica un péptido control derivado de la proteína no relacionada neuregulina 1 (péptido NRG acetil-WSFYSTSTPFLSLPE-amida) (*Cabedo, H., Luna, C., Fernández, A.M., Gallar, J y Ferrer-Montiel, A. (2002) Molecular determinants of the sensory and motor neuron-derived factor insertion into plasma membrane. J. Biol. Chem. 277, 19905-19912*).

Ensayo 2

Interacción *in vivo* del receptor TRPV1 con snapin y sinaptotagmina

La relevancia biológica de la interacción se estudió asociación de ambas proteínas con el receptor entero TRPV1 en células. Para ello, tanto el termoreceptor como las proteínas se transfectaron en células HEK293 y se procedió a investigar la formación de complejos TRPV1-snapin o TRPV1-sinaptotagmina mediante métodos inmunológicos utilizando anticuerpos específicos. Como células complementarias se utilizaron las células PC12. Las células HEK239 son una línea celular humana inmortalizada derivada de riñón embrionario que se utiliza ampliamente para expresar heterológicamente proteínas. La línea de células PC 12 se deriva de un feocromocitoma de rata y tienen la capacidad de diferenciarse a un fenotipo neuronal mediante tratamiento con NGF. También son comúnmente utilizadas para expresar y caracterizar proteínas y receptores neuronales. En ambas líneas celulares la inmunopurificación del receptor TRPV1 con un anticuerpo específico dirigido contra su C-terminal condujo a la co-inmunopurificación de las proteínas sinaptotagmina y snapin (Figura 3), indicando que el receptor TRPV1 se asocia con ambas proteínas en células.

Figura 3A. Formación de complejos *in vivo* entre el receptor TRPV1 y sinaptotagmina IX en células HEK expresando heterológicamente ambas proteínas.

Figura 3B. Formación de complejos *in vivo* entre el receptor TRPV1 y snapin en células HEK expresando heterológicamente ambas proteínas.

La asociación de las proteínas en neuronas se estudió mediante la co-localización subcelular del receptor TRPV1 y sinaptotagmina en cultivos primarios de neuronas del ganglio raquídeo (DRG) de ratas mediante inmunocitoquímica. La figura 4 muestra que, el receptor TRPV 1 se co-localizó con la proteína sinaptotagmina en neuronas DRG. Dado que ambas proteínas snapin y sinaptotagmina se encuentran en vesículas sinápticas, junto a la proteína VAMP2, se utilizó un anticuerpo contra VAMP2, para confirmar la presencia de TRPV1 en este tipo de vesículas. Los resultados

inmunocitoquímicos demostraron la co-distribución de TRPV1 y VAMP en neuronas DRG. En conjunto, estos datos demostraron que las proteínas sinaptotagmina y snapin interaccionaban con el receptor TRPV1 en células y que se co-localizaban en vesículas sinápticas neuronales. Este resultado sugirió un papel funcional para esta interacción, particularmente en el transporte del receptor TRPV1 a las terminales sinápticas.

Es conocido que la actividad funcional del receptor TRPV1 se incrementa notablemente en nociceptores sensibilizados por mediadores de la inflamación, y quizás en condiciones de trauma nervioso. La sensibilización inflamatoria neuronal se caracteriza por una disminución en los umbrales de respuesta de los nociceptores (las neuronas responden a temperaturas más bajas), así como en un aumento de la magnitud de la respuesta (la frecuencia en la generación de potenciales de acción se dispara drásticamente). La primera propiedad es debida a una alteración estructural, del receptor debido a su modificación química mediante fosforilación de residuos de serina. La segunda propiedad es debida a un incremento en la población de receptores activos en la superficie de la neuronal.

Los resultados indican que el incremento de actividad funcional en nociceptores sensibilizados está mediada, al menos en parte, por la incorporación de nuevos receptores mediante exocitosis regulada. El hecho de que las proteínas snapin y sinaptotagmina formen parte de un complejo molecular con TRPV1 en vesículas sinápticas implica un papel funcional para este complejo proteico en la biogénesis y tráfico de TRPV1 a las terminales sinápticas.

Por ejemplo, en respuesta a mediadores de la inflamación liberados en un proceso inflamatorio (bradicinina, ATP, NGF, prostaglandinas, interleucinas, sustancia P, acidez extracelular, etc.) las vesículas sinápticas conteniendo el receptor TRPV1 y las proteínas snapin y sinaptotagmina pueden ser movilizadas a la superficie celular para aumentar el número de receptores. Un mayor número de receptores permite a las neuronas incrementar su capacidad y magnitud de respuesta a estímulos nocivos. Una consecuencia de la sensibilización de los nociceptores es la aparición de hiperalgesia (respuesta exagerada a estímulos moderadamente nocivos) y la alodinia (respuesta dolorosa a estímulos no nocivos).

Ensayo 3

Potenciación de la actividad de TRPV1 con ésteres de forbol

Se ha diseñado un ensayo *ex vivo* basado en la expresión heteróloga del receptor TRPV1 y las proteínas en ovocitos de *Xenopus* que demuestra que el proceso de sensibilización de los nociceptores mediada por TRPV1 implica la incorporación de nuevos receptores TRPV1 a la superficie celular. Los ovocitos expresan el receptor con facilidad y además, por su carácter germinal, poseen unas vías de movilización vesicular molecularmente similares a las presentes en neuronas. Ello, pues, permite reproducir la movilización de vesículas en respuesta a mediadores de la inflamación en un modelo celular mucho más simple y de mejor manejo que los nociceptores.

El ensayo se basó en la expresión del receptor TRPV1 en ovocitos de *Xenopus* junto con snapin o sinaptotagmina, y la medida de la respuesta funcional a la estimulación repetida con 12-miristoato-13-acetato forbol (éster de forbol conocido como PMA).

Los ésteres de forbol como el PMA son agonistas débiles del receptor TRPV1 y a su vez activadores potentes de la proteína quinasa C (PKC). La activación de la PKC estimula el proceso de movilización exocitótica, aumentando la movilización de vesículas a la membrana celular. La actividad funcional del receptor TRPV1 se registró midiendo las corrientes iónicas que resultan de su actividad de canal iónico en respuesta al tratamiento con 1 μ M PMA. Las corrientes fónicas se monitorizaron mediante la técnica del pinzamiento de voltaje con dos microelectrodos ("Planells-Cases, R., Galiana-Gregori, R., Aracil, A., Merino, J., Gallar, J., Pérez-Payá, E., Belmonte, C. and Ferrer-Montiel, A.V. (2000) Arginine rich peptides are novel blockers of VR-1 channels with analgesic activity. *FEBS Letters*. 481, 131-136.", "García-Martínez, C., Humet, M., Planells-Cases, R., Gomis, A., Caprini, M., Viana, F., De la Peña, E., Sanchez-Baeza, F., Carbonell, T., De Felipe, C., Pérez-Payá, E., Belmonte, C., Messegue, A. and Ferrer-Montiel, A. (2001) Attenuation of thermal nociception and hyperalgesia by novel TRPV1 blockers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 2374-2379").

Cuando el receptor TRPV1 expresado heterológamente en ovocitos se estimuló repetidamente con PMA, se observó un aumento progresivo de la actividad del receptor con cada pulso de PMA (Fig. 4).

Figura 4A. Potenciación de la actividad funcional del receptor TRPV1 por aplicación secuencial de pulsos de 30 s del éster de forbol PMA a 1 μ M en ovocitos de *Xenopus*. Efecto inhibitorio de la toxina botulínica A.

Figura 4B. Inhibición de la potenciación de la actividad del receptor TRPV1 por incubación con la toxina botulínica A, y la sobre-expresión de la proteína snapin en ovocitos de *Xenopus*.

Así mismo se observó una disminución en el umbral de activación funcional del receptor TRPV1 debido, fundamentalmente, a la fosforilación del receptor TRPV1 por la proteína quinasa C estimulada por el PMA. Este fenotipo es similar al observado en nociceptores expuestos a PMA, así como a aquellos expuestos a mediadores de la inflamación. Por ello, la activación repetida de TRPV1 en ovocitos con PMA reproduce los acontecimientos funcionales que caracterizan la sensibilización inflamatoria neuronal. Por su simplicidad y reproducibilidad, se utilizó este ensayo para demostrar que la sensibilización por PMA implicaba la incorporación de receptores TRPV1 a la superficie celular.

Ensayo 4

La potenciación de la actividad de TRPV1 inducida por esteres de forbol se bloquea por snapin y toxina botulínica A

Se estudió el efecto de la toxina botulínica A (BoNT A) en ovocitos de *Xenopus*, que es un inhibidor altamente específico y potente de la exocitosis regulada. La toxina botulínica es una proteína que impide la fusión de vesículas sinápticas con la membrana celular. Por ello, para determinar si la potenciación de la respuesta de los receptores TRPV1 inducida por el PMA implicaba la incorporación de receptores a la superficie celular, se comparó la potenciación de la respuesta a PMA de ovocitos expresando TRPV1 no tratados y tratados con 1 μ M BoNT A. El tratamiento con BoNT A consistió en la inyección directa de la enzima en el citoplasma del ovocito mediante un equipo de microinyección. La inyección de BoNT A se produjo 12-48 h antes de realizar los registros funcionales.

Los resultados obtenidos muestran que el tratamiento con BoNT A de ovocitos expresando el receptor TRPV1 inhibió $\geq 40\%$ la potenciación de las corrientes iónicas evocadas por 1 μ M PMA, i.e. inhibió notablemente el proceso de sensibilización promovido por PMA (Fig. 4). Este dato demuestra que la sensibilización inducida por PMA implica la movilización vesicular de receptores a la superficie celular.

Para determinar el papel de los complejos TRPV1 con snapin y/o sinaptotagmina en el proceso de la potenciación, se evaluó el efecto de la sobre-expresión de snapin o sinaptotagmina con TRPV1 en ovocitos. Para estos experimentos, se co-inyectaron en ovocitos los RNAs que codifican a TRPV1 y snapin. Se comparó la potenciación de TRPV1 evocada por PMA en ovocitos que expresan solamente el receptor con aquellos que expresan TRPV1 y la proteína snapin. Al igual que ocurrió con el tratamiento con BoNT A, la sobre-expresión de snapin en ovocitos que expresan TRPV1 bloqueó en $\geq 50\%$ la potenciación de la actividad del canal iónico de TRPV1 provocada por 1 μ M PMA (Fig. 4). En conjunto, estos resultados indican que el proceso de sensibilización por PMA (y por extensión los mediadores de la inflamación en tejidos) implica la movilización de receptores TRPV1 a la superficie celular, y que en esta movilización juegan un papel fundamental los complejos formados por snapin-TRPV1 y sinaptotagmina-TRPV1. Así la alteración de estos complejos por la sobre-expresión de las proteínas snapin y sinaptotagmina afectó la magnitud del proceso de sensibilización. Por tanto, dichos complejos constituyen dianas terapéuticas para el tratamiento de la sensibilización de los nociceptores. La desestabilización y/o disrupción de dichos complejos disminuye la movilización de receptores inducida por mediadores de la inflamación a la superficie neuronal, por tanto, aboliendo la sensibilización inflamatoria. Los productos o compuestos que perturben los complejos descritos tendrán por ello actividad analgésica y/o antiinflamatoria. Estos compuestos pueden, pues, ser utilizados en ensayos de cribado (quimiotecas sintéticas y naturales) para buscar moduladores químicos que puedan ser desarrollados como fármacos analgésicos y/o antiinflamatorios.

Ensayo 5

Método de identificación de compuestos inhibidores de la interacción

Se evaluó la capacidad inhibidora de la formación del complejo N-TRPV1-sinaptotagmina IX por parte de un péptido derivado del dominio C2A (SEQ. N° 5) de la sinaptotagmina. La especificidad del ensayo se comprobó utilizando un péptido no relacionado, que imita la una secuencia de aminoácidos de la proteína neuronal neuregulina-1 (péptido NRG acetil-WSFYSTSTPFLSLPE-amida) (Cabedo, H., Luna, C., Fernández, A.M., Gallar, J y Ferrer-Montiel, (2002) *A. Molecular determinante of the sensory and motor neuron-derived factor insertion into plasma membrane. J. Biol. Chem.* 277, 19905-19912). El ensayo consiste en comparar la cantidad de complejo formada *in vitro* por el dominio N-terminal del receptor TRPV1 (amino ácidos 1-414) y las proteínas sinaptotagmina IX sintetizada *in vitro*, en ausencia y presencia de compuestos inhibidores como el péptido C2A. Como se muestra en la Figura 2, la presencia del péptido C2A inhibió la formación del complejo entre el N-TRPV1 y sinaptotagmina IX. Por el contrario, la presencia del péptido NRG no afectó la formación ni estabilidad del complejo proteico. Este es un ejemplo de ensayo que se puede utilizar para evaluar la capacidad inhibidora de formación de los complejos entre sinaptotagmina y/o snapin con TRPV1 por parte de productos químicos naturales o sintéticos.

Abreviaciones

3-AT, 3-amino-1,2,4 triazolío; ATP, adenosintrifosfato; BFP, proteína fluorescente azul; BoNTA, toxina botulínica A; cDNA, ácido desoxirribonucleico complementario; CFP, proteína fluorescente ciano; DRG, neuronas del ganglio raquídeo; ELISA, ensayo de la enzima inmovilizada; FLIPR, lector de placas por imagen fluorométrica; FPLC, cromatografía líquida de rápida resolución; FRET, resonancia de energía de transferencia de fluorescencia; GFP, proteína fluorescente verde; GST, glutatión-S-transferasa; HA, hemaglutinina; HPLC, cromatografía líquida de alta resolución; HTS, ensayo de cribado de alto rendimiento; MBP, proteína de unión a maltosa; NGF, factor de crecimiento neuronal; PCR, reacción de la polimerasa en cadena; PKA, proteína quinasa A; PKC, proteína quinasa C; PMA, 12-miristoato-13-acetato forbol; RFP, proteína fluorescente roja; RIA, radioinmunoensayo; SDS-PAGE, electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico; TRPV, receptores vanilloides (receptores de potencial transitorio subfamilia vanilloides); VAMP proteína de membrana asociada a vesículas; YFP, proteína fluorescente amarilla.

REIVINDICACIONES

1. Complejos macromoleculares implicados en la etiología del dolor, **caracterizados** por estar formados por la interacción de las proteínas vesiculares snapin y/o cualquiera de las isoformas de sinaptotagmina con el termorreceptor TRPV1.

2. Complejos macromoleculares según la reivindicación 1 donde las isoformas de sinaptotagmina se seleccionan entre las isoformas I, II o IX.

3. Complejos macromoleculares según la reivindicación 1, donde el dominio de interacción TRPV1 corresponde al dominio N-terminal de dicho receptor.

4. Complejos macromoleculares según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde el dominio de interacción de la proteína snapin corresponde a su dominio citosólico.

5. Complejos macromoleculares según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde el dominio de interacción de la proteína sinaptotagmina corresponde a su dominio citosólico.

6. Complejos macromoleculares según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde al menos una de las proteínas que los constituyen es una variante ortóloga de origen eucariota.

7. Complejos macromoleculares según la reivindicación 6, donde al menos una de las proteínas que los constituyen es una variante ortóloga de origen eucariota superior.

8. Complejos macromoleculares según las reivindicaciones 6 y 7, donde al menos una de las proteínas que los constituyen es una variante ortóloga de origen humano.

9. Complejos macromoleculares, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, **caracterizados** porque se encuentran localizados en vesículas sinápticas neuronales.

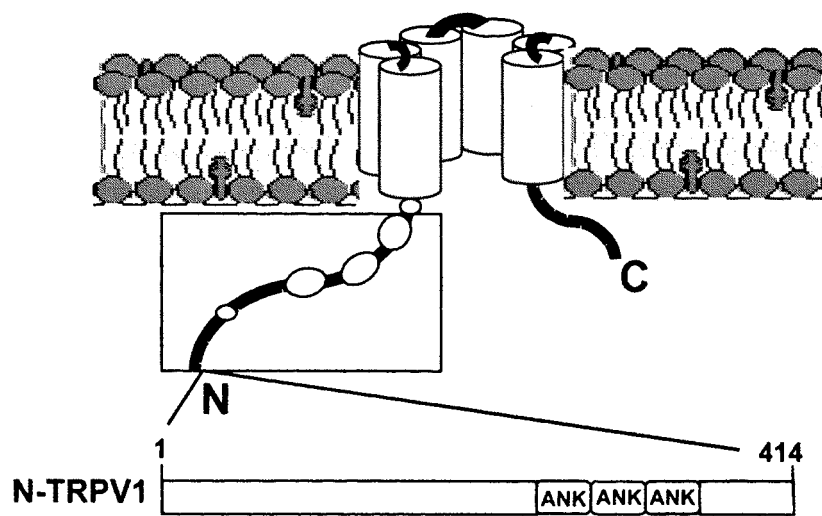
10. Complejos macromoleculares, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, **caracterizados** por transportar el TRPV 1 a la superficie de células nerviosas mediante exocitosis regulada.

11. Uso de los complejos macromoleculares, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, como dianas terapéuticas para buscar compuestos moduladores o inhibidores de la formación del complejo macromolecular.

12. Uso según la reivindicación 11 de los complejos macromoleculares, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, como dianas terapéuticas para el cribado de quimiotecas.

13. Uso según la reivindicación 11 de los complejos macromoleculares, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, como dianas terapéuticas para buscar compuestos con actividad analgésica y/o antiinflamatoria.

A



B

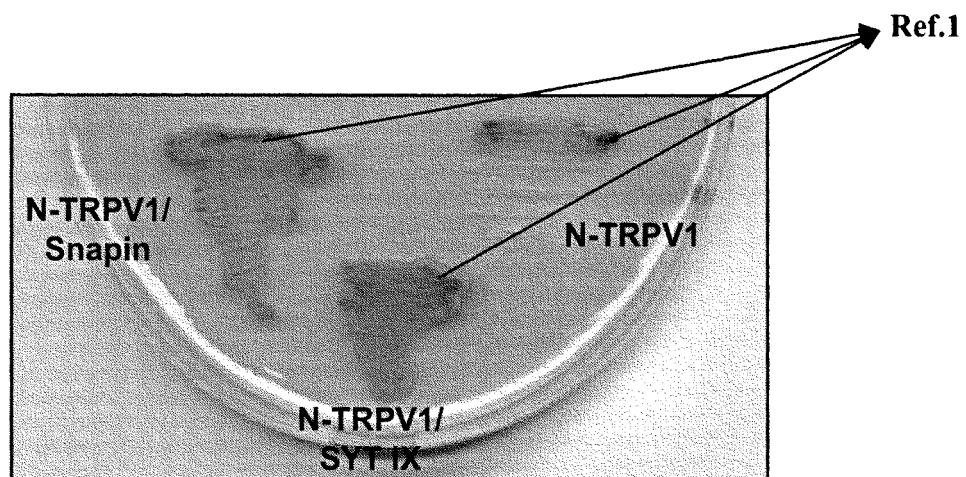


FIG. 1

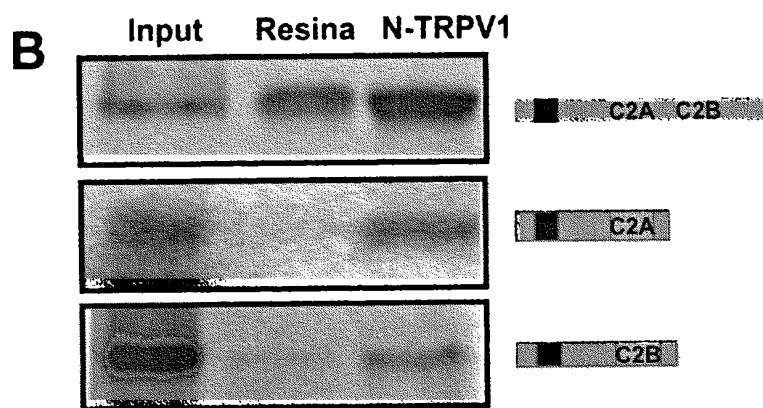
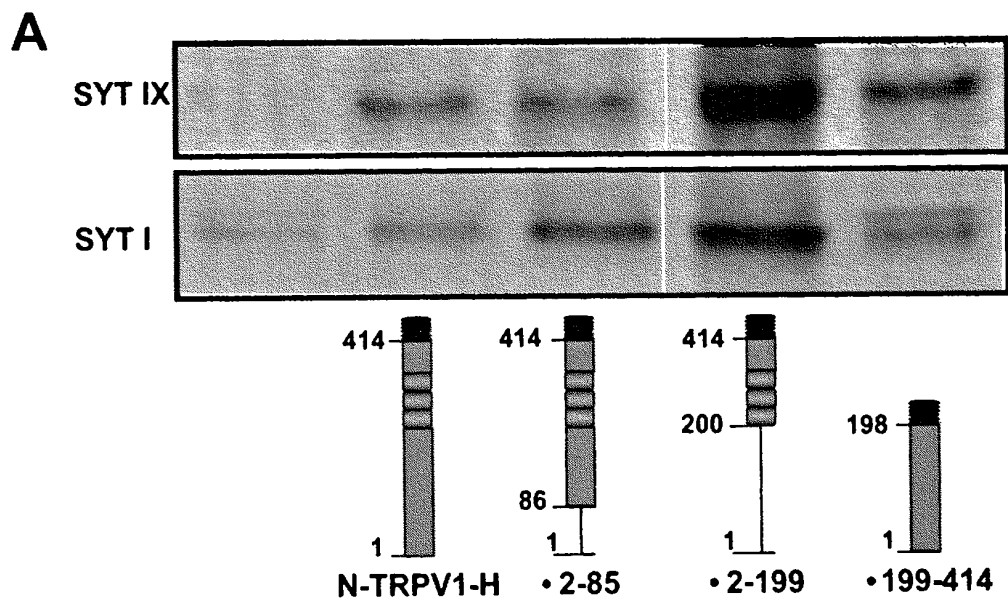
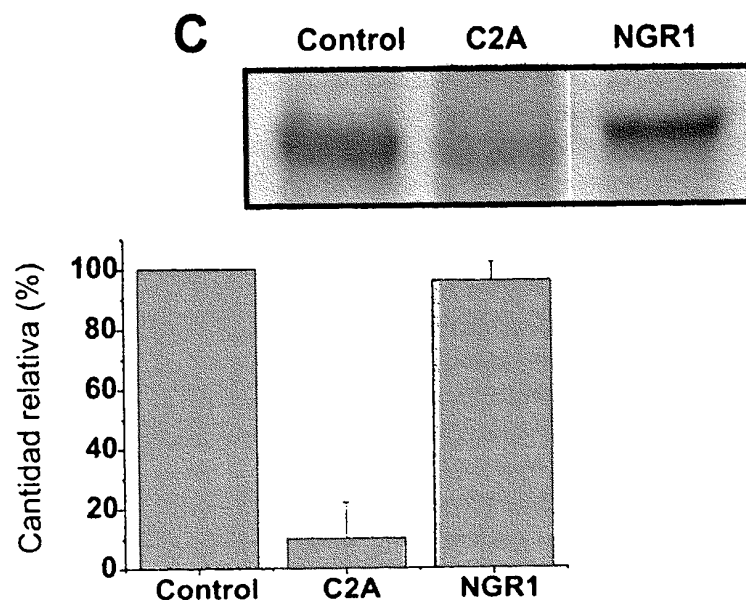


FIG. 2



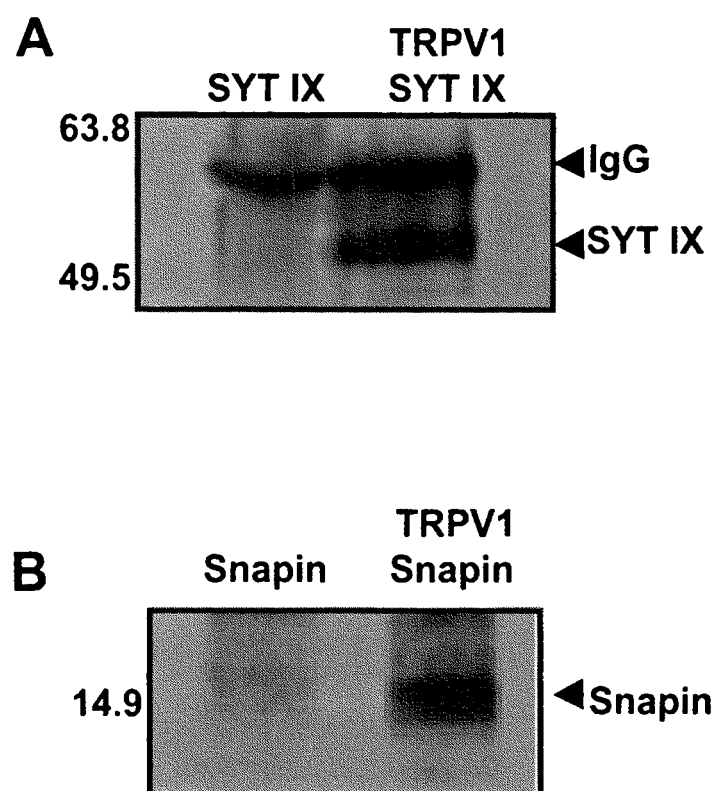


FIG. 3

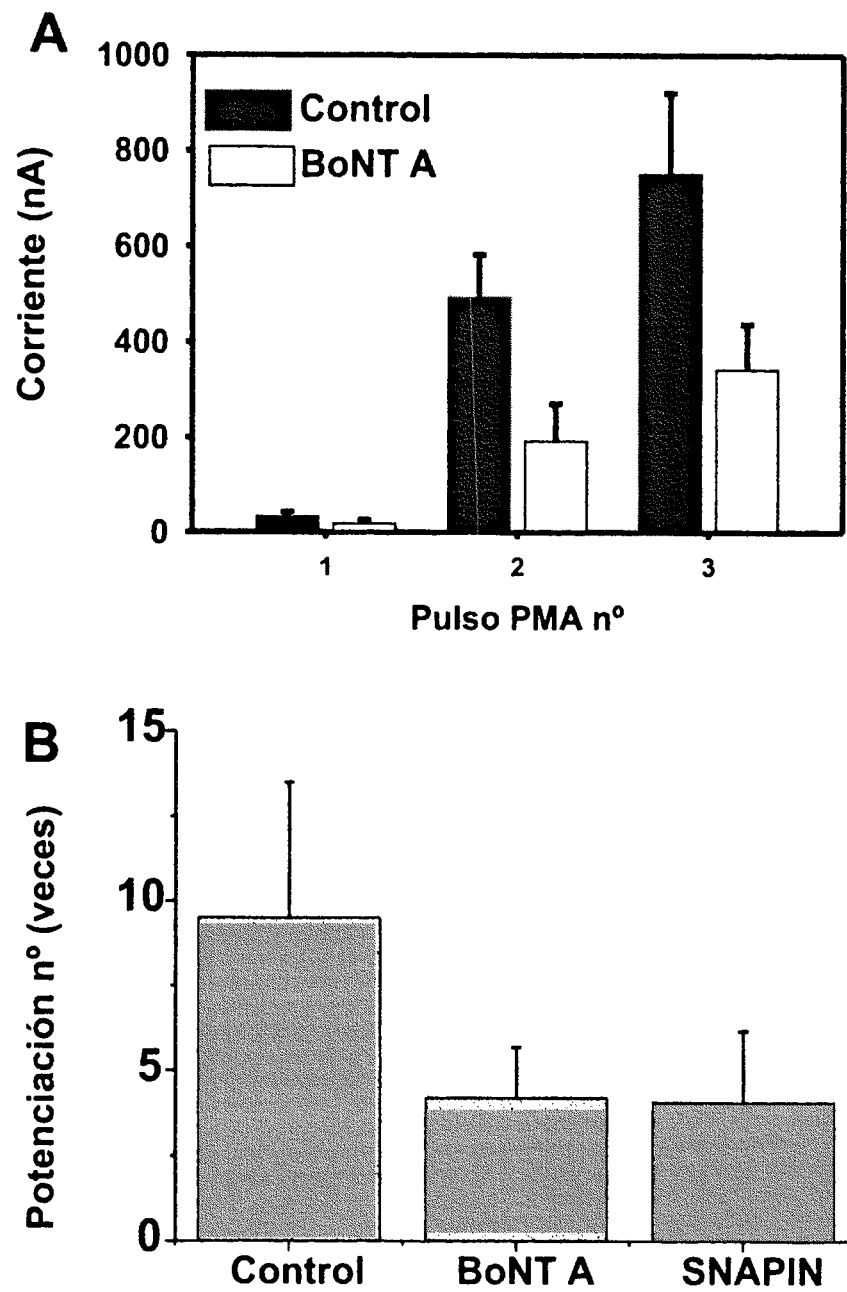


FIG. 4



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ ES 2 265 201

⑫ Nº de solicitud: 200301768

⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 25.07.2003

⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑮ Int. Cl.: Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	WO 9836081 A2 (MEMORIAL SLOAN-KETTERING CANCER CENTER) 20.08.1998, todo el documento.	1-13
A	GARCÍA-MARTÍNEZ, C. et al. "Attenuation of thermal nociception and hyperalgesia by VR1 blockers". PNAS. 19.02.2002. Vol. 99, nº 4, páginas 2374-2379, todo el documento.	1-13

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

04.01.2007

Examinador

M. Novoa Sanjurjo

Página

1/2

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

C07K 14/705 (2006.01)

C07K 14/435 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)