



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 332 628**

② Número de solicitud: 200702621

⑤ Int. Cl.:
A61K 38/08 (2006.01)
C07K 14/33 (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **05.10.2007**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **09.02.2010**

Fecha de la concesión: **12.01.2011**

⑮ Fecha de anuncio de la concesión: **24.01.2011**

⑯ Fecha de publicación del folleto de la patente:
24.01.2011

⑰ Titular/es: **Universidad de Zaragoza
Campus Plz. San Francisco
Edificio Interfacultades, 1 Planta
c/ Pedro Cerbuna, 12
50009 Zaragoza, ES
Universidad Autónoma de Barcelona**

⑱ Inventor/es: **Osta Pinzolas, Rosario;
Calvo Royo, Ana Cristina;
Muñoz Gonzalvo, María Jesús;
Aguilera Ávila, José;
Moreno Igoa, María y
Zaragoza Fernández, María Pilar**

⑲ Agente: **Pons Ariño, Ángel**

⑳ Título: **Uso de la secuencia codificante del dominio carboxilo terminal de la cadena pesada de la toxina tetánica como medicamento.**

㉑ Resumen:

Uso de la secuencia codificante del dominio carboxilo terminal de la cadena pesada de la toxina tetánica como medicamento.

Uso de la secuencia codificante del dominio del extremo carboxilo terminal de la cadena pesada de la toxina tetánica como medicamento, preferentemente en el tratamiento de la Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA), así como el polipéptido codificado por dicha secuencia para el tratamiento de la mencionada enfermedad.

ES 2 332 628 B1

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

DESCRIPCIÓN

Uso de la secuencia codificante del dominio carboxilo terminal de la cadena pesada de la toxina tetánica como medicamento.

La presente invención se refiere al uso de la secuencia codificante del dominio del extremo carboxilo terminal de la cadena pesada de la toxina tetánica como medicamento, preferentemente en el tratamiento de la Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA), así como el polipéptido codificado por dicha secuencia para el tratamiento de la mencionada enfermedad.

Antecedentes de la invención

La Esclerosis Lateral Amiotrófica (enfermedad de Lou Gehrig's o de Charcot) es una enfermedad progresiva, incurable y mortal que cursa con la degeneración de motoneuronas a nivel medular, bulbar y de cortex motor. En el caso de España, la enfermedad presenta una incidencia de 2/100.000 y una prevalencia de 1/10.000, lo que indica que aproximadamente 40.000 españoles desarrollarán la enfermedad a lo largo de su vida (fuente: Asociación Española de Esclerosis Lateral Amiotrófica -ADELA-).

A pesar de ser una enfermedad declarada como tal desde hace largo tiempo, aún no se conocen con exactitud las causas que la originan y, aunque existen formas genéticas de la misma, también son conocidos casos en los que no parece tener un origen hereditario. Así, se estima que el 10% de los casos son de origen genético, las formas familiares, de los cuales un 15-20% se corresponden con mutaciones a nivel de la enzima Superóxido Dismutasa (SOD-1.) e incluso también se han observado mutaciones en esta enzima en formas esporádicas de la enfermedad (Brown, R.H. Jr. (1997). Arch. Neurol. 54(10) 1246-1250). Mutaciones en NFH, gen que codifica para la cadena pesada de los neurofilamentos, también han sido encontradas de forma excepcional en algún enfermo de esclerosis lateral amiotrófica. Consecuentemente, la investigación de la herencia genética de esta enfermedad presenta gran interés.

En los últimos años, la creación de modelos animales de la enfermedad ha sido una de las herramientas más relevantes en los estudios de tratamiento experimental, que han servido para aclarar algunas dudas sobre sus causas, aunque todavía éstas son desconocidas en gran medida. Ni los ratones knockout para la enzima SOD-1, ni los animales transgénicos para la diferentes mutaciones en la enzima SOD-1 humana han conseguido reproducir un cuadro clínico similar a la enfermedad en humanos. El animal que más se aproxima al desarrollo de la enfermedad es un transgénico que presenta varias copias de la Superóxido dismutasa mutada en su posición 93, es el llamado SOD1G93A (Tu, P.H., *et al.* (1996.) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 93(7): 3155-3160.) que es suministrado por The Jackson Laboratory.

A pesar de los numerosos estudios realizados tanto para conocer su causa como su mecanismo por el momento no existen tratamientos clásicos efectivos. Actualmente, se encuentran en desarrollo tres líneas de investigación basadas en la aplicación de antagonistas del glutamato, factores neurotróficos y antioxidantes, aunque hasta la fecha ninguna de ellas a desembocado en un tratamiento eficaz.

Desde hace unos años se conoce la capacidad de los factores neurotróficos para rescatar a la motoneuronas de la degeneración. De gran interés han resultado las experiencias de terapia génica realizadas en modelos animales, utilizando vectores adenovirales que expresan diversos factores neurotróficos (GDNF, CNTF, NI-4, IGF-1), que han ofrecido resultados esperanzadores. Sin embargo, las inyecciones adenovirales presentan el inconveniente de tener que aplicarse en animales neonatos debido a la gran respuesta inmunitaria que ocasionan. Por tanto, aunque sus resultados sean esperanzadores resulta imprescindible el desarrollo de nuevos vectores menos inmunogénicos que posibiliten un tratamiento efectivo de la ELA.

En relación a los ensayos clínicos que han sido llevados a cabo hasta la fecha, los iniciados en el año 1996 por el Dr. Schuelp no obtuvieron resultados satisfactorios (<http://www.wiley.co.uk/genetherapy>), barajándose como las posibles causas del fracaso: la naturaleza del factor neurotrófico utilizado en los ensayos (CNTF) y/o su falta de accesibilidad al Sistema Nervioso Central. En 1999, el grupo del Dr. Axel Kahn comprobó en modelos animales que efectivamente la vía de administración de dicho factor neurotrófico resulta un factor importante para su efecto terapéutico (Haase *et al.* (1999) Ann. Neurol. 45(3) 296-304). Esta falta de especificidad también ha sido propuesta como causa probable del fracaso en la administración de BDNF en humanos de forma subcutánea.

Por otra parte, cuando los factores neurotróficos son administrados de forma sistémica presentan problemas de toxicidad al actuar sobre otros tejidos. A pesar de todos estos inconvenientes las posibilidades terapéuticas de los factores neurotróficos no han dejado de investigarse debido a sus prometedores resultados en fase preclínica. Concretamente, el último ensayo clínico que está teniendo lugar en el Medical Center in Rochester (Minnesota) se basa de nuevo en la administración de un factor neurotrófico, IGF-1.

Descripción de la invención

Los autores de la presente invención han descubierto que el dominio carboxilo terminal, no tóxico, de la cadena pesada de la toxina tetánica (HcTeTx), que hasta la fecha únicamente había sido utilizado en el tratamiento de ELA como vehículo de diversos factores neurotróficos, así como de la enzima SOD-1, mediante la creación de proteínas de fusión, es capaz por si solo de prolongar la supervivencia de modelos animales de la enfermedad.

Muy interesantes han sido los resultados “*in vivo*” arrojados por la inyección de la secuencia codificante de HcTeTx desnuda, que ha conseguido prolongar la supervivencia de los animales modelo tratados de 23 días, respecto al tratamiento con HcTeTx. Este hecho presenta a la secuencia codificante de HcTeTx como una alternativa con una eficacia dos veces superior a la propia terapia con proteína recombinante HcTeTx.

5 Así, un primer aspecto de la invención se relaciona con el uso de un polinucleótido que comprende la secuencia codificante de HcTeTx aislada, sus variantes alélicas o fragmentos funcionales de las mismas para la elaboración de un medicamento, preferentemente para el tratamiento de ELA. En una realización preferida de la invención la secuencia
10 HcTeTx abarca desde el triplete codificante del aminoácido V (Valina) del extremo amino terminal de HcTeTx hasta el triplete que codifica para el aminoácido D (Aspartato), preferentemente del aminoácido V(854) a D (1315) de la secuencia con número de acceso (NCBI.: PO4958). En una realización todavía más preferida de este aspecto de la invención la secuencia codificante de HcTeTx es la SEQ ID NO:1 y el fragmento de HcTeTx es la SEQ ID NO:5. En adelante este polinucleótido será denominado como “*polinucleótido de la invención*”.

15 En otra realización preferida, el polinucleótido de la invención puede encontrarse mutado (delección, inserción, inversión, mutación puntual, etc.) donde dichas mutaciones no afectan a su capacidad para actuar como medicamento, concretamente para el tratamiento de ELA. El mantenimiento del efecto terapéutico del polinucleótido de la invención mutado puede ser comprobado mediante la reproducción de cualquiera de los ejemplos I y II. A lo largo de la descripción estos polinucleótidos mutados serán considerados también como variantes alélicas.

20 En una realización también preferida el polinucleótido de la invención puede comprender además secuencias promotoras, terminadoras, silenciadoras, secuencias que faciliten su integración en cromosomas o cualquier tipo de estructura organizativa del material genético, etc.

25 Un segundo aspecto de la invención, está referido al uso de un vector que comprende al polinucleótido de la invención para la elaboración de un medicamento, preferentemente para el tratamiento de ELA, donde dicho vector es seleccionado del grupo que comprende, sin ningún tipo de limitación, plásmidos, fagos, cósmidos, fagémidos, cromosomas artificiales de levaduras (YAC), cromosomas artificiales de bacterias (BAC), cromosomas humanos artificiales (HAC), vectores virales, tales como adenovirus, retrovirus o cualquier otro tipo de molécula de DNA o ARN con
30 capacidad para replicarse en el interior de una célula, procariota o eucariota. En adelante este vector será denominado como “*vector de la invención*”.

Un tercer aspecto de la invención está referido al uso de una célula transgénica para la elaboración de un medicamento, preferentemente para el tratamiento de ELA, donde dicha célula comprende al polinucleótido de la invención o al vector de la invención.

35 Un cuarto aspecto de la invención se refiere al uso de un polipéptido aislado que comprende la secuencia de HcTeTx, sus variantes alélicas o sus fragmentos funcionales de las mismas para la elaboración de un medicamento para el tratamiento de ELA. En una realización preferida de la invención la secuencia de HcTeTx abarca desde el aminoácido V(854) a D(1315) de la secuencia con número de acceso (NCBI.: PO4958). En una realización todavía más preferida de este aspecto de la invención, la secuencia de HcTeTx es la SEQ ID NO:2 y el fragmento de HcTeTx es la SEQ ID NO:6. En adelante este polinucleótido será denominado como “*polipéptido de la invención*”.

45 En otra realización preferida, el polipéptido de la invención está mutado (delección, inserción, inversión, sustituciones puntuales de aminoácidos, etc.), aunque dichas mutaciones no afectan a su capacidad para actuar como medicamento en el tratamiento de ELA. El mantenimiento del efecto terapéutico del polipéptido de la invención mutado puede ser comprobado mediante la reproducción de los ejemplos 1-2.

50 Para la administración del medicamento o la composición farmacéutica el polinucleótido, los vectores, las células transgénicas o polipéptido de la invención se formularán en una forma farmacéutica adecuada para su administración, por la vía de administración elegida. Para ello, dicha composición farmacéutica incluirá los vehículos y excipientes farmacéuticamente aceptables necesarios para la elaboración de la forma farmacéutica de administración elegida. Información sobre excipientes o vehículos que pueden ser utilizados en la elaboración de dicha composición farmacéutica, así como sobre formas farmacéuticas de administración de principios activos, en general, puede encontrarse
55 en el libro “Tratado de Farmacia Galénica”, de C. Fauli i Trillo, 1ª Edición, 1993, Luzán 5, S.A. de Ediciones.

Dicha composición farmacéutica comprende, al menos, cualquiera de los elementos del grupo que comprende: el polinucleótido, los vectores, las células transgénicas o el polipéptido de la invención deben encontrarse en una cantidad terapéuticamente efectiva. En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión “cantidad terapéuticamente efectiva” se refiere a la cantidad del elemento seleccionado calculada para producir el efecto deseado y, en general, vendrá determinada, entre otras causas, por las características propias del propio elemento polipéptido y el efecto terapéutico a conseguir, las características del individuo que vaya a ser tratado, la severidad de la enfermedad que padezca dicho individuo, etc. En adelante esta composición farmacéutica será conocida como “*composición farmacéutica o medicamento de la invención*”.

65 La composición farmacéutica de la invención puede ser administrada por cualquier vía de administración apropiada, por ejemplo, por vía oral, parenteral, nasal (mucosa), etc., típicamente, por vía parenteral, ventajosamente, mediante su administración intramuscular o subcutánea. Asimismo, dicha composición farmacéutica puede presentar-

se en cualquier forma de presentación apropiada para su administración, por ejemplo, en forma de presentación sólida (comprimidos, cápsulas, gránulos, etc.), líquida (soluciones, suspensiones, emulsiones, etc.), etc., para su administración por la vía de administración elegida. En una realización preferida, dicha composición farmacéutica se formula en forma de una forma farmacéutica de dosificación unitaria apropiada.

En una realización preferida, la composición farmacéutica puede estar en una forma farmacéutica de administración por vía oral, bien en forma sólida, preferentemente líquida, más preferentemente lista para su administración vía intramuscular. Ejemplos ilustrativos de formas farmacéuticas de administración por vía oral incluyen comprimidos, cápsulas, granulados, soluciones, suspensiones, etc., y pueden contener los excipientes convencionales, tales como aglutinantes, diluyentes, desintegrantes, lubricantes, humectantes, etc., y pueden ser preparadas por métodos convencionales. En otra realización preferida, las composiciones farmacéuticas también pueden ser adaptadas para su administración parenteral, en forma de, por ejemplo, soluciones, suspensiones o productos liofilizados, estériles, en la forma de dosificación apropiada; en este caso, dichas composiciones farmacéuticas incluirán los excipientes adecuados, tales como tampones, tensioactivos, etc. En cualquier caso, los excipientes se elegirán en función de la forma farmacéutica de administración seleccionada. Una revisión de las distintas formas farmacéuticas de administración de fármacos y de su preparación puede encontrarse en el libro "Tratado de Farmacia Galénica", de C. Faulí i Trillo, 10 Edición, 1993, Luzán 5, S.A. de Ediciones, citado *supra*. Además, la composición farmacéutica puede comprender otros polipéptidos, policleótidos, vectores, o células que aporten una mayor eficacia y a la composición.

Definiciones

El término "polinucleótido", tal y como se utiliza en esta memoria, se refiere a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud, ya sean desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos. Este término se refiere exclusivamente a la estructura primaria de la molécula. Así, este término incluye DNA bi- y mono-catenario, así como RNA bi- y mono-catenario.

El término "aislado" a lo largo de la descripción cuando se emplea en asociación con HcTeTx o su secuencia codificante, no únicamente está referido a que éstos se encuentran aislados del cuerpo humano, sino que además no se están formando parte de proteínas o enzimas de fusión que vayan a ejercer una función terapéutica.

La expresión "fragmento funcional de HcTeTx, variantes alélicas de la misma o las secuencias que las codifican" está referida a lo largo de la descripción a un péptido o un polinucleótido que comprende una porción de HcTeTx, sus variantes alélicas o sus secuencias codificantes, que mantienen su capacidad para actuar como medicamento, más concretamente para el tratamiento de ELA, donde el mantenimiento de su capacidad terapéutica puede ser comprobado mediante la reproducción de los ejemplos 1-3.

El término "variante alélica" se refiere a lo largo de la descripción a un polipéptido sustancialmente homólogo y funcionalmente equivalente al dominio C-terminal de la cadena pesada de la toxina tetánica. Tal como aquí se utiliza, un péptido es "sustancialmente homólogo" a dicho dominio cuando su secuencia de aminoácidos tiene un grado de identidad respecto a la secuencia de aminoácidos de dicho dominio de, al menos, un 60%, 70%, 85% y, más preferentemente de, al menos, un 95%. Preferentemente la secuencia aminoacídica del mencionado dominio es la SEQ ID NO:2. Este término también está referido en la descripción a un polinucleótido capaz de codificar un polipéptido sustancialmente homólogo y funcionalmente equivalente a HcTeTx. De este modo, el polinucleótido podrá tener una homología de al menos un 40%, 50%, 60%, 70%, 85% ó 95% con el polinucleótido codificante de HcTeTx, cuya secuencia nucleotídica es preferentemente la SEQ ID NO:1.

La expresión "funcionalmente equivalente", tal y como se emplea a lo largo de la descripción, significa que el polipéptido o el polipéptido mantiene su capacidad para actuar como medicamento, más concretamente para el tratamiento de ELA, donde el mantenimiento de su capacidad terapéutica puede ser comprobado mediante la reproducción del ejemplo I o II.

Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

Breve descripción de las figuras

Figura 1. Amplificación por PCR para la detección de la expresión de HcTeTx. Diez días tras la inyección intramuscular del plásmido pCMV-HcTeTx (n=2, calles 1 y 2) y del plásmido vacío pCMV (n=2, calles 3 y 4) se extrajo el RNA del músculo y se procedió a la retrotranscripción. El cDNA obtenido se amplificó por PCR para el gen HcTeTx. La calle 5 muestra el control positivo (plásmido pCMV-HcTeTx) y en la calle 6 se cargó el blanco de la reacción. En la calle M se encuentra el marcador de talla de 100 pb.

Figura 2. Efectos del tratamiento con DNA desnudo codificante para HcTeTx sobre el comienzo de los síntomas en ratones modelo para la enfermedad de ELA SOD1 G93A. La manifestación de los síntomas se retrasó significativamente en el grupo tratado con HcTeTx (n=5) con respecto al grupo control (n=10). Las probabilidades acumuladas se calcularon mediante el análisis de supervivencia de Kaplan-Meier (SPSS 13.0).

Figura 3. Efectos del tratamiento con DNA desnudo codificante para HcTeTx sobre la supervivencia en ratones modelo para la enfermedad de ELA SOD1 G93A. La supervivencia aumentó notablemente en el grupo tratado con HcTeTx (n=5) con respecto al grupo control (n=10). Las probabilidades acumuladas se calcularon mediante el análisis de supervivencia de Kaplan-Meier (SPSS 13.0).

5

Figura 4. Efectos del tratamiento con DNA desnudo codificante para HcTeTx sobre La actividad motora se determinó mediante el rotarod a una velocidad constante de 14 rpm, con un tiempo máximo de desarrollo de 180 s. Se observa una mejor actividad motora en el grupo tratado con HcTeTx (n=5) respecto al control (n=10 control).

Figura 5. Western blot de las muestras de médula espinal de ratones wild type y ratones SOD1 G93A. A) Detección de Akt fosforilado en ratones control (inyectados con pcDNA3.1) e inyectados con HcTeTx. Se midió la expresión de GAPDH para la normalización de las medidas de intensidad de banda obtenidas a partir de Akt fosforilado. B) Representación gráfica de los niveles de Akt fosforilado en función de la intensidad de banda para los distintos grupos de muestras (controles, inyectados con HcTeTx). Los test ANOVA y t-Student revelaron que los niveles de Akt fosforilado en los ratones inyectados con HcTeTx era significativamente superior que la observada en los controles.

Figura 6. Los niveles de mRNA de caspasa-3, caspasa-1, NCS-1 y Rrad se cuantificaron en médula espinal de ratones sintomáticos SOD1G93A a los 110 días de edad. La figura presenta la disminución de la expresión de los genes caspasa-3, caspasa-1 y Rrad en los animales tratados con HcTeTx con respecto al grupo control, mientras que la expresión del gen NCS-1 se encuentra incrementada en el grupo tratado. Los niveles de expresión génica se normalizaron con la media geométrica de los genes endógenos GAPDH, 18s rRNA y β -actina y se tabularon como ratio de SOD1 G93A y wild type. (** P<0,01, * P <0,05; n=4 por punto).

Figura 7. Efectos del tratamiento intraperitoneal con el polipeptido que contiene el dominio C terminal de la cadena pesada de la toxina tetánica (HcTeTx) sobre la supervivencia en ratones modelo para la enfermedad de ELA SOD1G93A. La supervivencia aumentó notablemente en el grupo tratado con HcTeTx (n= 3, línea punteada) con respecto al grupo control (n=3, línea continua). Las probabilidades acumuladas se calcularon mediante el análisis de supervivencia de Kaplan-Meier (SPSS 13.0).

30

Exposición detallada de modos de realización

A continuación se ilustrará la invención mediante los ensayos realizados por los inventores, que ponen de manifiesto la eficacia de HcTeTx, así como de su secuencia codificante, para su uso como medicamento, y más preferentemente para el tratamiento de ELA.

35

Ejemplo 1

La administración de HcTeTx vía inyección intramuscular de DNA desnudo retrasa el comienzo de los síntomas y prolonga la supervivencia en ratones SOD1G93A

La generación de animales transgénicos que sobreexpresan el gen para la superóxido dismutasa-1 (SOD-1) humana con distintas mutaciones ha proporcionado modelos animales para el estudio de la enfermedad de ELA. Estos animales presentan características clínicas y patológicas propias de los enfermos de ELA. Uno de los modelos más estudiados y caracterizados es el ratón transgénico SOD1 G93A, que presenta una mutación por sustitución del aminoácido glicina por alanina en posición 93 en el gen para la enzima SOD-1. En este modelo animal se han probado con éxito diversos compuestos terapéuticos. Sin embargo no se ha traducido en una terapia efectiva en ensayos clínicos humanos, ya sea por una inadecuada ruta de administración y/o por la escasa biodisponibilidad de las moléculas terapéuticas para alcanzar las células diana. Algunas estrategias de terapia génica incluyen el uso del virus adenoasociado (AAV), que es transportado retrógradamente a motoneuronas tras inyección intramuscular. Sin embargo existe la posibilidad de que el uso de vectores virales pueda causar daños añadidos en los enfermos tratados. La utilización del DNA desnudo se presenta como una estrategia alternativa más segura y apropiada para hacer llegar a los enfermos un gen terapéutico específico.

55

Materiales y métodos

1.1 DNA desnudo codificante para HcTeTx

60

El gen codificante para HcTeTx (dominio C-terminal de la cadena pesada de la toxina tetánica -SEQ ID NO:2 de 462 aminoácidos-) fue clonado en el plásmido de expresión eucariota pcDNA3.1 (Invitrogen), bajo control del promotor del citomegalovirus (CMV). Los vectores se produjeron en bacterias *Escherichia coli* (DH5 α) químicamente competentes y se purificaron utilizando el kit GenElute maxiprep de Sigma-Aldrich.

65

ES 2 332 628 B1

1.2 Ratones transgénicos

Los ratones transgénicos que sobreexpresan SOD1 humana con la mutación G93A (B6SJL-TgN[SOD1-G93A] 1Gur) se obtuvieron de The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME). Se utilizaron mutantes hemizigóticos en todos los experimentos (un macho mutante apareado con una hembra no transgénica). Los ratones transgénicos se identificaron por amplificación por PCR del DNA extraído de la cola, como se describe en Gurney *et al.* (Gurney *et al.*, 1994. Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation. *Science*, 264 (5166): 1772-5). Los animales se conservaron en la Unidad Mixta de Investigación de la Universidad de Zaragoza. Se les proporcionó agua y comida *ad libitum*. Todos los experimentos y cuidados en los animales fueron desarrollados de acuerdo con las normas de la Universidad de Zaragoza y la guía internacional para el uso de animales de laboratorio.

1.3 Inyección intramuscular de DNA desnudo y extracción de músculo

A la edad de 8 semanas se inyectaron intramuscularmente ratones transgénicos SOD1 G93A con 300 µg de pCMV-HcTeTx en los músculos cuádriceps (dos inyecciones de 50 µg por músculo) y en los músculos tríceps (una inyección única de 50 µg por músculo). El grupo de ratones control fue inyectado con las mismas cantidades de plásmido vacío.

Diez días después de las inyecciones intramusculares de los plásmidos, se extrajeron los músculos inoculados que fueron precongelados en nitrógeno líquido y posteriormente almacenados a -70°C.

1.4 Extracción de RNA, síntesis de cDNA y amplificación por PCR

Los tejidos se congelaron en nitrógeno líquido y seguidamente fueron pulverizados en un mortero frío. El RNA total de los músculos fue extraído de acuerdo con el protocolo de TRIzol Reagent (Invitrogen). Para la síntesis de cDNA se empleó el kit SuperScript™ First-Strand Synthesis System (Invitrogen), partiendo de 1 µg de RNA en un volumen final de 20 µL. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un volumen final de 20 µL, con 150nM de cada cebador, 150 µM de dNTPs, 2 mM de MgCl₂, IX de buffer, 0,2U Taq pol y 2 µL por reacción de cDNA diluido 10 veces para la amplificación de un fragmento del gen HcTeTx. Todas las reacciones de PCR se realizaron en GeneAmp® Thermal Cycler 2720 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Los parámetros de ciclos termales fueron los siguientes: incubación a 94°C durante 3 min y 35 ciclos de 94°C durante 30 s, 61°C durante 30 s y 72°C durante 30 s. La presencia de la amplificación del gen HcTeTx se observó en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. Las secuencias de los cebadores directo y reverso empleadas fueron las SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO:4, respectivamente. La talla del amplicón corresponde a 355 pb.

1.5 Test de rotarod, prueba de la rejilla y supervivencia

La prueba de la rejilla se utilizó para determinar la fuerza muscular y el comienzo de los síntomas de ELA. Los animales realizaron este test una vez por semana desde la edad de 8 semanas. Cada ratón fue colocado sobre una rejilla que sirve de tapa para las jaulas convencionales. La rejilla fue después girada 180° y mantenida a una distancia de aproximadamente 60 cm de una superficie blanda para evitar lesiones. Se cronometró la latencia de cada ratón a caer. Cada uno de los ratones tuvo hasta tres tentativas para sujetarse en la rejilla invertida durante un máximo de 180 s y se registró el período de tiempo más largo.

El test de rotarod fue empleado para evaluar la coordinación motora, la fuerza y el equilibrio. Los animales fueron colocados sobre la barra giratoria del aparato (ROTA-ROD/RS, LE8200, LSI-LETICA Scientific Instruments). Se registró el tiempo durante el cual un animal podía mantenerse en dicha barra a una velocidad constante de 14 rpm. Cada ratón tuvo tres oportunidades y se registró el período de tiempo más largo sin que los animales cayeran de la barra, tomando arbitrariamente un tiempo límite de 180 s.

El punto final en la vida de los ratones se considero cuando el animal colocado de cubito supino no fue capaz de volverse sobre si mismo.

Resultados

2.1 Detección de la expresión del plásmido en músculo

Inicialmente se confirmó la capacidad del vector pCMV-HcTeTx construido de expresar el gen codificante en las células musculares de los ratones transgénicos SOD1G93A. Debido a que no existe expresión endógena del gen HcTeTx en estos ratones, se aplicó a los músculos inyectados la amplificación por PCR de un fragmento de este gen para la detección de la expresión del mRNA de dicha molécula. Como muestra la Figura 1., no se observa expresión del gen HcTeTx en el grupo control inyectado con plásmido vacío. Sin embargo la PCR revela la presencia de la amplificación del gen HcTeTx en el músculo inoculado con el vector codificante para el mismo, indicando que el vector alcanza con éxito las células musculares y que se realiza el proceso de transcripción de dicho gen.

2.2 HcTeTx retrasa la manifestación de los síntomas, mejora la capacidad motora y prolonga la supervivencia de los ratones transgénicos SOD1G93A

El tratamiento intramuscular con DNA desnudo codificante para HcTeTx produce un retraso en el comienzo de los síntomas, mejora la actividad motora y pospone el punto final de la enfermedad en el ratón modelo para ELA, que contiene la mutación G93A en el gen SOD1 humano. La manifestación de los síntomas se registró como el primer día en el que los ratones no pudieron mantenerse sujetos en la rejilla invertida durante tres minutos. El comienzo de los síntomas se redujo muy significativamente en aproximadamente 17 días en el grupo de animales inyectados con HcTeTx, con respecto al grupo control (Figura 2. y Tabla 1.). Como se observa en la Figura 3 y en la Tabla 1, la máxima supervivencia se detectó en los ratones del grupo tratado con HcTeTx, que alcanzaron una media de 139 días; 27 días más que el grupo control, que representa una prolongación de la supervivencia de aproximadamente un 16%. Entre las semanas 12 y 13 se observa un descenso notable en el desarrollo de la actividad sobre el rotarod del grupo control, mientras que en el grupo de animales tratados no se observan esas deficiencias hasta la semana 16 (Figura 4).

TABLA 1

Tabla donde se recogen los datos de la manifestación de los síntomas y la supervivencia, tanto en el grupo control como en el tratado con HcTeTx, así como el valor P (Log Rank, Mantel-Cox)

	Control (n=10)	HcTeTx (n=5)	Valor P
Comienzo de síntomas	97,5 ± 2,5	114,8 ± 2,6	0,001
Mortalidad	116,6 ± 4,1	139,0 ± 3,8	0,011

Ejemplo 2

Inhibición de la apoptosis en médula espinal de ratones SOD1G93A tratados mediante inyección intramuscular de DNA desnudo codificante para HcTeTx

Materiales y métodos

1.1 DNA desnudo codificante para HcTeTx

El gen codificante para HcTeTx (dominio C-terminal de la cadena pesada de la toxina tetánica, SEQ ID NO:1) fue clonado en el plásmido de expresión eucariota pcDNA3.1 (Invitrogen), bajo control del promotor del citomegalovirus (CMV). Los vectores se produjeron en bacterias *Escherichia coli* (DH5 α) químicamente competentes y se purificaron utilizando el kit Genelute maxiprep de Sigma-Aldrich.

1.2 Ratones transgénicos

Los ratones transgénicos que sobreexpresan SOD1 humana con la mutación G93A (B6SJL-TgN[SOD1-G93A]1Gur) se obtuvieron de The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME). Se utilizaron mutantes hemizigóticos en todos los experimentos (un macho mutante apareado con una hembra no transgénica). Los ratones transgénicos se identificaron por amplificación por PCR del DNA extraído de la cola, como se describe en Gurney *et al.* (Gurney *et al.*, 1994. Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation. *Science*, 264 (5166): 1772-5). Los animales se conservaron en la Unidad Mixta de Investigación de la Universidad de Zaragoza. Se les proporcionó agua y comida *ad libitum*. Todos los experimentos y cuidados animales fueron desarrollados de acuerdo con las normas de la Universidad de Zaragoza y la guía internacional para el uso de animales de laboratorio. Se emplearon un total de 12 animales: wild-type (n=4), ratones SOD1G93A inyectados con pcDNA3.1 (controles, n=4) y ratones SOD1G93A tratados con HcTeTx (n=4).

1.3 Inyección intramuscular de DNA desnudo y extracción de médula espinal

A la edad de 8 semanas se inyectaron intramuscularmente ratones transgénicos SOD1G93A con 300 μ g de pCMV-HcTeTx en los músculos cuádriceps (dos inyecciones de 50 μ g por músculo) y en los músculos tríceps (una inyección única de 50 μ g por músculo). El grupo de ratones control fue inyectado con las mismas cantidades de plásmido vacío.

Las médulas espinales se extrajeron 110 días después de las inyecciones intramusculares de los plásmidos, que fueron precongelados en nitrógeno líquido y posteriormente almacenados a -70°C. Los tejidos se congelaron en nitrógeno líquido y seguidamente fueron pulverizados en un mortero frío. La mitad de la muestra se empleó para la extracción de RNA y la otra mitad se utilizó para la extracción proteica.

ES 2 332 628 B1

1.4 Extracción de RNA de médula espinal y síntesis de cDNA

El RNA total de las médulas espinales fue extraído de acuerdo con el protocolo de RNeasy® Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen). Para la síntesis de cDNA se empleó el kit SuperScript™ First-Strand Synthesis System (Invitrogen), partiendo de 2 μ L de RNA en un volumen final de 20 μ L.

1.5 PCR en tiempo real

Las reacciones de PCR en tiempo real se llevaron a cabo en un volumen final de 10 μ L, con 1X de TagMan® Universal PCR Master Mix, No AmpErase® UNG (Applied Biosystems), 1X de la mezcla de cebadores no marcados y sondas TagMan® MGB (Applied Biosystems) para cada gen a estudio y 1 μ L por reacción de cDNA diluido 10 veces. Para la normalización se emplearon 3 genes endógenos (18s rRNA, GAPDH y β -actina). Las referencias de la mezcla de cebadores y sondas empleadas para amplificar cada uno de los genes a estudio fueron las siguientes: caspasa-3 (Mm00438023_m1), caspasa-1 (Mm00438023_m1), NCS-1 (Mm00490552_m1), Rrad (Mm00451053_m1), 18s rRNA (Hs99999901), GAPDH (4352932E) y β -actina (4352933E). Todas las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems). Los parámetros de ciclos termales fueron los siguientes: incubación a 95°C durante 10 min y 40 ciclos de 95°C durante 15 s y 60°C durante 1 min. La expresión relativa de caspasa-3, caspasa-1, NCS-1 y Rrad fue normalizada aplicando la media geométrica de los tres genes endógenos.

1.6 Extracción de proteína de médula espinal y análisis de Western blot

Las muestras de médula espinal de ratones wild type y ratones SOD1G93A tratados con HcTeTx se homogeneizaron en nitrógeno líquido con el buffer de extracción de composición 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH=7,5, 1% desoxicolato, 0,1% SDS, 1% Tritón X-100, 1 mM NaOva, 1 mM PMSF, 10 μ g/mL leupeptina y aprotinina y 1 μ g/mL pepstatina. Se centrifugó a 4°C, durante 10 minutos a 3000 g. Una vez cuantificada la concentración de proteína del sobrenadante de cada muestra mediante el método de BCA (9643 Sigma), se cargaron 25 μ g de proteína en un gel al 10% de acrilamida. Se utilizaron membranas de PVDF para el proceso de transferencia, las cuales se bloquearon con solución TTBS al 5% de leche desnatada (20 mM Tris base, 0,15M NaCl, pH=7,5, 0,1% Tween) durante una hora. Más tarde se incubaron con el anticuerpo primario toda la noche a 4°C (anti-p-Akt (sc-7985R, Sta. Cruz)). Se utilizó GAPDH (Gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa) para normalizar la medida obtenida con Akt (anti-GAPDH (sc-25778, Sta. Cruz)). Tras incubar con el anticuerpo primario, las membranas se lavaron con TTBS y se incubaron con el anticuerpo secundario 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente, se procedió a revelar mediante quimioluminiscencia (Western Blotting Luminol Reagent, sc-2048 Sta. Cruz). Las películas se escanearon y se analizaron mediante el software AlphaEase FC (Bonsai Technologies). El análisis estadístico se llevó a cabo usando el test de ANOVA y el test de Student-Neuman-Keuls.

40 Resultados

En este estudio se presentan los resultados de la aplicación de HcTeTx sobre ratones SOD1G93A modelo para la enfermedad de ELA, donde existe una degeneración de las motoneuronas. El estudio transcripcional (Figura 6) a nivel de médula espinal de estos ratones, en edad sintomática, revela una disminución de la expresión génica de caspasa-3 ($p < 0,01$) y caspasa-1 ($p < 0,05$) en aquellos ratones tratados con HcTeTx con respecto a los inyectados con plásmido vacío. Esto indica una reducción de la apoptosis en médula espinal debida al tratamiento. Además, el gen NCS-1 se encuentra significativamente aumentado ($p < 0,05$) en el grupo de animales tratados, indicando un aumento de la supervivencia celular en la médula de los mismos. Por otro lado, la expresión del gen Rrad (Ras related associated with diabetes), descrito como una proteína de unión al calcio, también se encuentra aumentado en médula espinal de estos animales con respecto al wild type. Tras el tratamiento con HcTeTx se observa que el efecto es revertido llegando a niveles más próximos a los de los animales no transgénicos (Figura 6).

	media \pm desviación standard
wild type (control)	0,264 \pm 0,04 a
G93A (control)	0,242 \pm 0,03 b
Hc-TeTx	0,378 \pm 0,04 c

En la tabla se expresa la media y la desviación estándar de los valores de densidad de banda medidos en cada grupo de muestras. Los subíndices a, b y c, que representan al grupo de los individuos salvajes (wild type; WT), de los inyectados con pcDNA3.1 (G93A, control) y de los inyectados con HcTeTx respectivamente, difieren entre sí con una significación $p < 0,05$.

ES 2 332 628 B1

Los resultados obtenidos mediante Western blot mostraron que la presencia de Akt fosforilado en ratones inyectados con HcTeTx es mayor que la obtenida en los controles. El test de ANOVA y de Student-Neuman-Keuls indicó la existencia de diferencias significativas ($p < 0,05$) entre el grupo de los controles y el grupo de los ratones inyectados con HcTeTx, confirmando que la activación de la vía de supervivencia de Akt en ratones inyectados con HcTeTx puede favorecer la inhibición de la apoptosis y, por tanto, la supervivencia neuronal, con respecto a los controles (Figura 5).

Ejemplo 3

Incremento de supervivencia en ratones SOD1G93A modelos para la esclerosis lateral amiotrófica tras la administración vía inyección intraperitoneal de un polipéptido que comprende el dominio C-terminal de la cadena pesada de la toxina tetánica (HcTeTx)

Materiales y Métodos

1.1 Extracción del polipéptido que comprende el dominio C-terminal de la cadena pesada de la toxina tetánica (HcTeTx)

El polipéptido utilizado (denominado HcTeTx) utilizado corresponde al dominio C-terminal de la cadena pesada de la toxina tetánica y comprende la secuencia de 451 aminoácidos (SEO ID NO:1) de la SEQ ID N° 2, y ha sido obtenido siguiendo el protocolo descrito por Gil *et al.* (Gil *et al.*, 2003. *Biochem. J.* 373,613-620).

1.2 Ratones transgénicos

Los ratones transgénicos que sobreexpresan SOD1 humana con la mutación G93A (B6SJL-TgN[SOD1-G93A]1Gur) se obtuvieron de The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME). Se utilizaron mutantes hemizigóticos en todos los experimentos (un macho mutante apareado con una hembra no transgénica). Los ratones transgénicos se identificaron por amplificación por PCR del DNA extraído de la cola, como se describe en Gurney *et al.* (Gurney *et al.*, 1994. *Science*, 264 (5166): 1772-5). Los animales se conservaron en la Unidad Mixta de Investigación de la Universidad de Zaragoza. Se les proporcionó agua y comida *ad libitum*. Todos los experimentos y cuidados animales fueron desarrollados de acuerdo con las normas de la Universidad de Zaragoza y la guía internacional para el uso de animales de laboratorio.

1.3 Inyección intraperitoneal del polipéptido en los animales

A la edad de 12 semanas se inyectaron intraperitonealmente los ratones transgénicos SOD1G93A con 250 μ l a una concentración de 0.5 μ M del polipéptido que comprende el dominio C terminal de la toxina tetánica (HcTeTx). La inyección fue repetida semanalmente durante toda la vida.

1.4 Medida de la supervivencia en los animales

El punto final en la vida de los ratones se considero cuando el animal colocado de cubito supino no fue capaz de volverse sobre si mismo.

Resultados

1.1.- HcTeTx prolonga la supervivencia de los ratones transgénicos SOD1G93A

Como se observa en la Figura 7 y en la Tabla 2, la máxima supervivencia se detectó en los ratones del grupo tratado con HcTeTx, que alcanzaron una media de 135 días; 9 días más que el grupo control.

TABLA 2

Tabla donde se recogen los datos de la supervivencia, tanto en el grupo control como en el tratado con HcTeTx, así como el valor P

	Control (n=3)	HcTeTx (n=3)	Valor P
Mortalidad	126 \pm 4	135 \pm 2	0,021

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de un polinucleótido aislado que comprende la secuencia codificante del dominio carboxilo terminal de la subunidad pesada de la toxina tetánica (HcTeTx), sus variantes alélicas o fragmentos funcionales de las mismas para la elaboración un medicamento.
2. Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde el HcTeTx es codificado por la SEQ ID NO: 1.
- 10 3. Uso según la reivindicación 1 donde el fragmento de la secuencia codificante del dominio carboxilo terminal de la subunidad pesada de la toxina tetánica tiene la SEQ ID NO: 6.
4. Uso de un vector que comprende cualquiera de los polinucleótidos de las reivindicaciones anteriores para la elaboración de un medicamento.
- 15 5. Uso de una célula transgénica que comprende cualquiera de los polinucleótidos de las reivindicaciones 1-3 para la elaboración de un medicamento.
- 20 6. Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde el medicamento es para el tratamiento de la esclerosis lateral amiotrófica (ELA).
7. Uso de un polipéptido aislado que comprende el dominio carboxilo terminal de la subunidad pesada de la toxina tetánica (HcTeTx), sus variantes alélicas o fragmentos funcionales de los mismos para la elaboración un medicamento para el tratamiento de ELA.
- 25 8. Uso según la reivindicación anterior donde HcTeTx tiene la SEQ ID NO: 2.
9. Uso según la reivindicación 7 donde el fragmento funcional de HcTeTx tiene la SEQ ID NO: 5.
- 30 10. Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde el medicamento está destinado a su administración vía oral, parenteral, intramuscular o nasal.

35

40

45

50

55

60

65

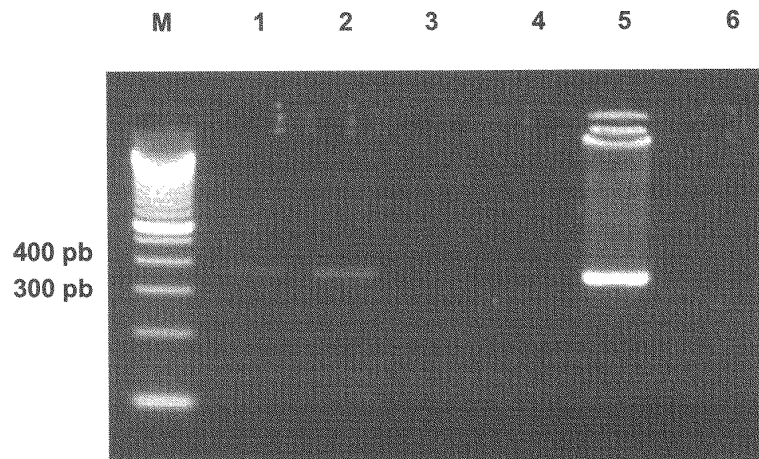


FIG. 1.

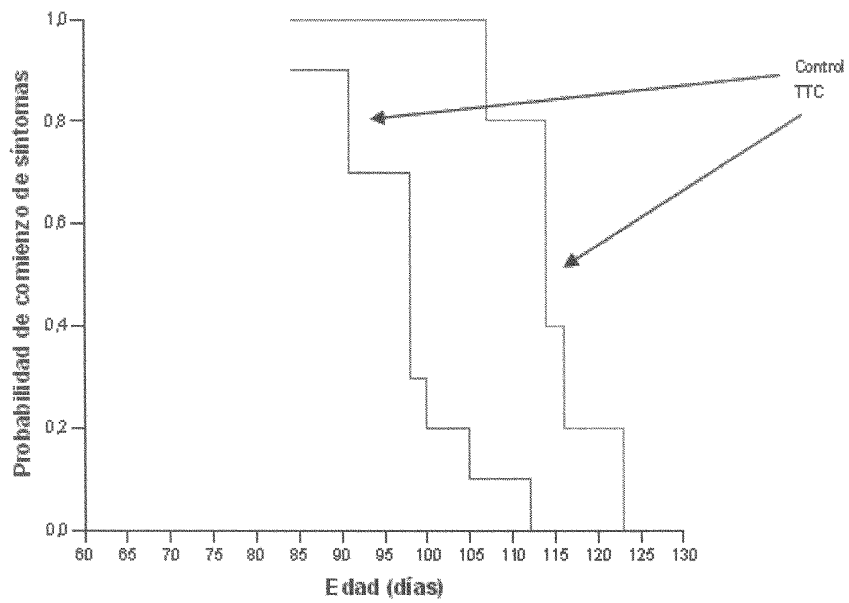


FIG. 2.

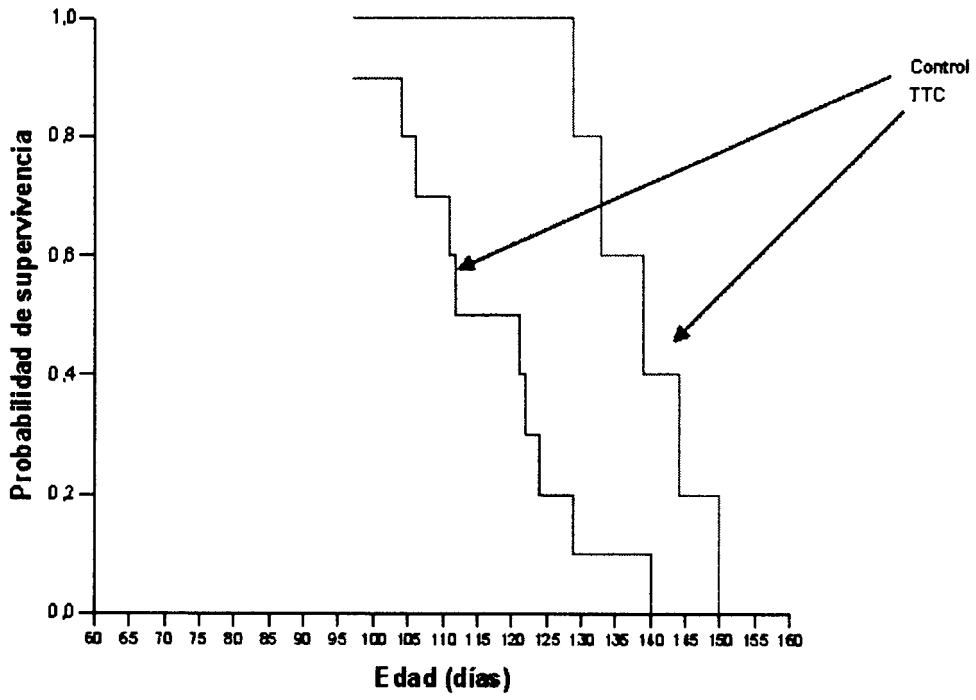


FIG. 3.

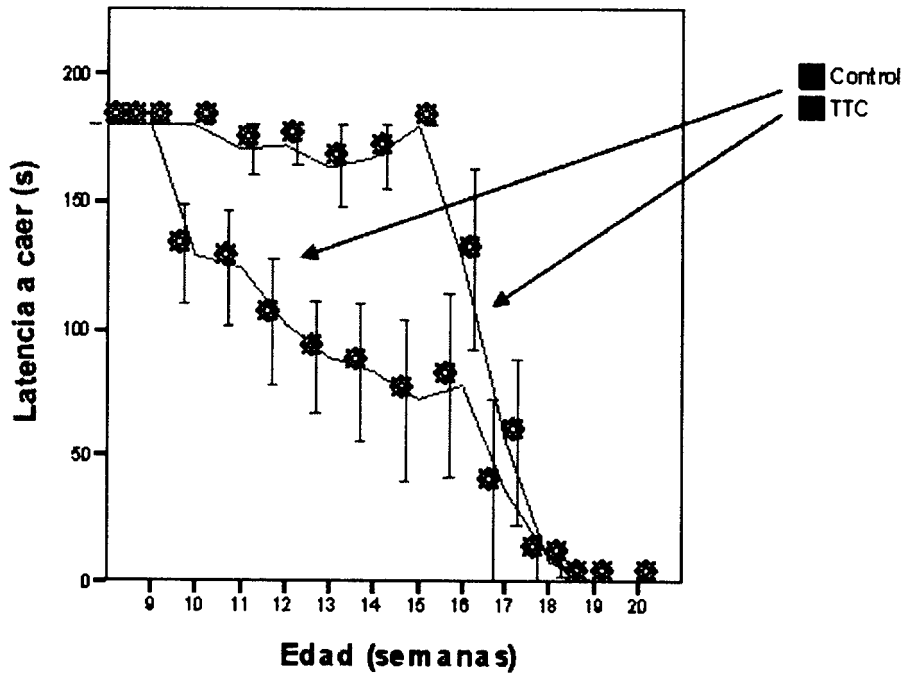
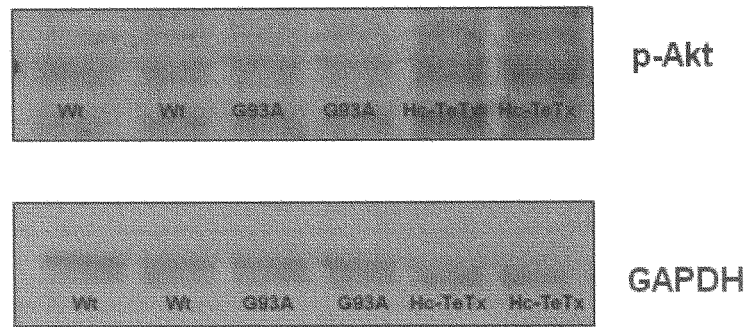


FIG. 4.

A)



B)

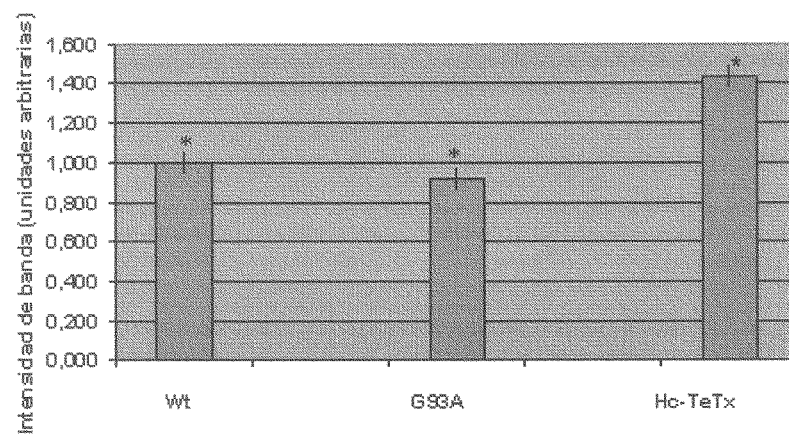


FIG. 5.

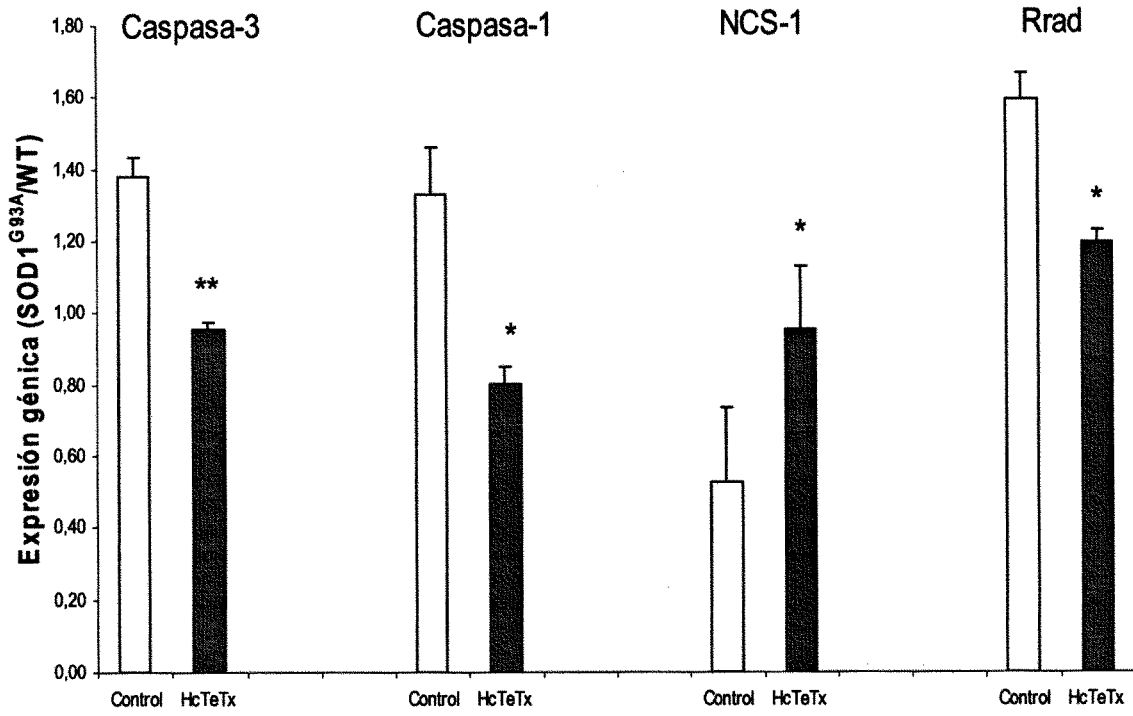


FIG. 6.

Funciones de supervivencia

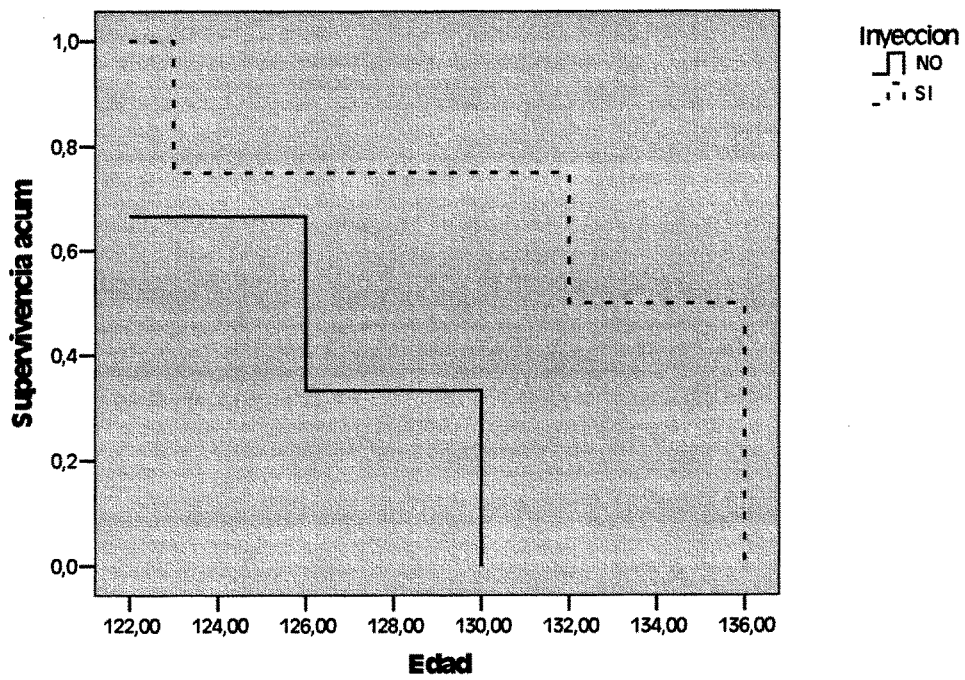


FIG. 7.

ES 2 332 628 B1

LISTA DE SECUENCIAS

<110> UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA
UNIVERSIDAD DE AUTONOMA DE BARCELONA

5

<120> USO DE LA SECUENCIA CODIFICANTE DEL DOMINIO CARBOXILO TERMINAL LA CADENA PESADA DE LA TOXINA TETÁNICA COMO MEDICAMENTO.

<130> ES1510.16

10

<160> 6

<170> PatentIn version 3.4

15

<210> 1

<211> 1392

<212> DNA

20

<213> *Clostridium tetani*

<400> 1

25

atggtttttt caacaccaat tccattttct tattctaaaa atctggattg ttggggtgat 60

aatgaagaag atatagatgt tatattaaaa aagagtacaa ttttaaattt agatattaat 120

aatgatatta tatcagatat atctggggtt aattcatctg taataacata tccagatgct 180

30

caattggtgc ccggaataaa tggcaaagca atacatttag taaacaatga atcttctgaa 240

gttatagtgc ataaagctat ggatattgaa tataatgata tgtttaataa ttttaccggt 300

agcttttggg tgagggttcc taaagtatct gctagtcatt tagaacaata tggcacaaat 360

35

gagtattcaa taattagctc tatgaaaaaa catagtctat caataggatc tggttggagt 420

gtatcactta aaggtaataa cttaatatgg actttaaaag attccgcggg agaagttaga 480

40

caaataactt ttagggattt acctgataaa tttaatgctt atttagcaaa taaatggggt 540

tttataacta ttactaatga tagattatct tctgctaatt tgtatataaa tggagttactt 600

atgggaagtg cagaaattac tggtttagga gctattagag aggataataa tataacatta 660

45

aaactagata gatgtaataa taataatcaa tacgtttcta ttgataaatt taggatattt 720

tgcaaagcat taaatccaaa agagattgaa aaattataca caagttattt atctataacc 780

tttttaagag acttctgggg aaacccttta cgatatgata cagaatatta ttttaatacca 840

50

gtagcttcta gttctaaaga tgttcaattg aaaaatataa cagattatat gtatttgaca 900

aatgcgccat cgtatactaa cggaaaattg aatatatatt atagaagggtt atataatgga 960

55

ctaaaattta ttataaaaag atatacacct aataatgaaa tagattcttt tgttaaatca 1020

ggtgatttta ttaaattata tgtatcatat aacaataatg agcacattgt aggttatccg 1080

aaagatggaa atgcctttaa taatcttgat agaattctaa gagtaggtta taatgccccca 1140

60

ggtatccctc tttataaaaa aatggaagca gtaaaattgc gtgatttaaa aacctattct 1200

gtacaactta aattatatga tgataaaaat gcatcttttag gactagtagg taccataat 1260

ggtcaaatag gcaacgatcc aaatagggat atattaattg caagcaactg gtactttaat 1320

65

catttaaaag ataaaatttt aggatgtgat tgggtactttg tacctacaga tgagggatgg 1380

acaaatgatt aa 1392

ES 2 332 628 B1

<210> 2

<211> 462

<212> PRT

5 <213> *Clostridium tetani*

<400> 2

10 Val Phe Ser Thr Pro Ile Pro Phe Ser Tyr Ser Lys Asn Leu Asp Cys
1 5 10 15

15 Trp Val Asp Asn Glu Glu Asp Ile Asp Val Ile Leu Lys Lys Ser Thr
20 25 30

20 Ile Leu Asn Leu Asp Ile Asn Asn Asp Ile Ile Ser Asp Ile Ser Gly
35 40 45

25 Phe Asn Ser Ser Val Ile Thr Tyr Pro Asp Ala Gln Leu Val Pro Gly
50 55 60

30 Ile Asn Gly Lys Ala Ile His Leu Val Asn Asn Glu Ser Ser Glu Val
65 70 75 80

35 Ile Val His Lys Ala Met Asp Ile Glu Tyr Asn Asp Met Phe Asn Asn
85 90 95

40 Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg Val Pro Lys Val Ser Ala Ser His
100 105 110

45 Leu Glu Gln Tyr Gly Thr Asn Glu Tyr Ser Ile Ile Ser Ser Met Lys
115 120 125

50 Lys His Ser Leu Ser Ile Gly Ser Gly Trp Ser Val Ser Leu Lys Gly
130 135 140

55 Asn Asn Leu Ile Trp Thr Leu Lys Asp Ser Ala Gly Glu Val Arg Gln
145 150 155 160

60 Ile Thr Phe Arg Asp Leu Pro Asp Lys Phe Asn Ala Tyr Leu Ala Asn
165 170 175

65 Lys Trp Val Phe Ile Thr Ile Thr Asn Asp Arg Leu Ser Ser Ala Asn
180 185 190

70 Leu Tyr Ile Asn Gly Val Leu Met Gly Ser Ala Glu Ile Thr Gly Leu
195 200 205

75 Gly Ala Ile Arg Glu Asp Asn Asn Ile Thr Leu Lys Leu Asp Arg Cys
210 215 220

80 Asn Asn Asn Asn Gln Tyr Val Ser Ile Asp Lys Phe Arg Ile Phe Cys
225 230 235 240

ES 2 332 628 B1

<212> DNA

<213> Secuencia artificial (cebador)

5 <400> 4

tcgtaaaggg tttccccaga a

21

<210> 5

<211> 451

10

<212> PRT

<213> *Clostridium tetani*

15

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(451)

<223> Fragmento de la SEQ ID NO:2

20

<400> 5

25

Lys Asn Leu Asp Cys Trp Val Asp Asn Glu Glu Asp Ile Asp Val Ile
1 5 10 15

Leu Lys Lys Ser Thr Ile Leu Asn Leu Asp Ile Asn Asn Asp Ile Ile
20 25 30

30

Ser Asp Ile Ser Gly Phe Asn Ser Ser Val Ile Thr Tyr Pro Asp Ala
35 40 45

35

Gln Leu Val Pro Gly Ile Asn Gly Lys Ala Ile His Leu Val Asn Asn
50 55 60

40

Glu Ser Ser Glu Val Ile Val His Lys Ala Met Asp Ile Glu Tyr Asn
65 70 75 80

Asp Met Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg Val Pro Lys
85 90 95

45

Val Ser Ala Ser His Leu Glu Gln Tyr Gly Thr Asn Glu Tyr Ser Ile
100 105 110

50

Ile Ser Ser Met Lys Lys His Ser Leu Ser Ile Gly Ser Gly Trp Ser
115 120 125

Val Ser Leu Lys Gly Asn Asn Leu Ile Trp Thr Leu Lys Asp Ser Ala
130 135 140

55

Gly Glu Val Arg Gln Ile Thr Phe Arg Asp Leu Pro Asp Lys Phe Asn
145 150 155 160

60

Ala Tyr Leu Ala Asn Lys Trp Val Phe Ile Thr Ile Thr Asn Asp Arg
165 170 175

Leu Ser Ser Ala Asn Leu Tyr Ile Asn Gly Val Leu Met Gly Ser Ala
180 185 190

65

Glu Ile Thr Gly Leu Gly Ala Ile Arg Glu Asp Asn Asn Ile Thr Leu

ES 2 332 628 B1

	195					200					205					
5	Lys	Leu	Asp	Arg	Cys	Asn	Asn	Asn	Gln	Tyr	Val	Ser	Ile	Asp	Lys	
		210				215					220					
10	Phe	Arg	Ile	Phe	Cys	Lys	Ala	Leu	Asn	Pro	Lys	Glu	Ile	Glu	Lys	Leu
	225					230					235					240
15	Tyr	Thr	Ser	Tyr	Leu	Ser	Ile	Thr	Phe	Leu	Arg	Asp	Phe	Trp	Gly	Asn
					245					250					255	
20	Pro	Leu	Arg	Tyr	Asp	Thr	Glu	Tyr	Tyr	Leu	Ile	Pro	Val	Ala	Ser	Ser
				260					265					270		
25	Ser	Lys	Asp	Val	Gln	Leu	Lys	Asn	Ile	Thr	Asp	Tyr	Met	Tyr	Leu	Thr
			275					280					285			
30	Asn	Ala	Pro	Ser	Tyr	Thr	Asn	Gly	Lys	Leu	Asn	Ile	Tyr	Tyr	Arg	Arg
		290					295					300				
35	Leu	Tyr	Asn	Gly	Leu	Lys	Phe	Ile	Ile	Lys	Arg	Tyr	Thr	Pro	Asn	Asn
	305					310					315					320
40	Glu	Ile	Asp	Ser	Phe	Val	Lys	Ser	Gly	Asp	Phe	Ile	Lys	Leu	Tyr	Val
					325					330					335	
45	Ser	Tyr	Asn	Asn	Asn	Glu	His	Ile	Val	Gly	Tyr	Pro	Lys	Asp	Gly	Asn
				340					345					350		
50	Ala	Phe	Asn	Asn	Leu	Asp	Arg	Ile	Leu	Arg	Val	Gly	Tyr	Asn	Ala	Pro
			355					360					365			
55	Gly	Ile	Pro	Leu	Tyr	Lys	Lys	Met	Glu	Ala	Val	Lys	Leu	Arg	Asp	Leu
		370				375						380				
60	Lys	Thr	Tyr	Ser	Val	Gln	Leu	Lys	Leu	Tyr	Asp	Asp	Lys	Asn	Ala	Ser
	385					390					395					400
65	Leu	Gly	Leu	Val	Gly	Thr	His	Asn	Gly	Gln	Ile	Gly	Asn	Asp	Pro	Asn
					405					410					415	
70	Arg	Asp	Ile	Leu	Ile	Ala	Ser	Asn	Trp	Tyr	Phe	Asn	His	Leu	Lys	Asp
				420					425					430		
75	Lys	Ile	Leu	Gly	Cys	Asp	Trp	Tyr	Phe	Val	Pro	Thr	Asp	Glu	Gly	Trp
			435					440					445			
80	Thr	Asn	Asp													
		450														

<210> 6

<211> 1359

ES 2 332 628 B1

<212> DNA

<213> *Clostridium tetani*

5 <400> 6

	atgaaaaatc	tggattggtg	ggttgataat	gaagaagata	tagatggtat	attaaaaaag	60
	agtacaattt	taaatrtaga	tattaataat	gatattatat	cagatatatc	tgggtttaat	120
10	tcatctgtaa	taacatatcc	agatgctcaa	ttggtgcccg	gaataaatgg	caaagcaata	180
	catttagtaa	acaatgaatc	ttctgaagtt	atagtcata	aagctatgga	tattgaatat	240
15	aatgatatgt	ttaataatrt	taccgtagc	ttttggttga	gggttcctaa	agtatctgct	300
	agtcatttag	aacaatatgg	cacaaatgag	tattcaataa	ttagctctat	gaaaaaacat	360
	agtctatcaa	taggatctgg	ttggagtgta	tcacttaaag	gtaataactt	aatatggact	420
20	ttaaaagatt	ccgcgggaga	agttagacaa	ataactttta	gggatttacc	tgataaatrt	480
	aatgcttatt	tagcaaataa	atgggttttt	ataactatta	ctaatagatag	attatcttct	540
	gctaatttgt	atataaatgg	agtacttatg	ggaagtgcag	aaattactgg	tttaggagct	600
25	attagagagg	ataataatat	aacattaaaa	ctagatagat	gtaataataa	taatcaatac	660
	gtttctattg	ataaatrttag	gatattttgc	aaagcattaa	atccaaaaga	gattgaaaaa	720
30	ttatacacia	gttatrtatc	tataaccttt	ttaagagact	tctggggaaa	ccctttacga	780
	tatgatacag	aatattatrt	aataccagta	gcttctagtt	ctaaagatgt	tcaattgaaa	840
	aatataacag	attatatgta	tttgacaaat	gcgccatcgt	ataactaacgg	aaaattgaaat	900
35	atatattata	gaaggttata	taatggacta	aaatttatta	taaaaagata	tacacctaat	960
	aatgaaatag	attctrttgt	taaatacagg	gattttatta	aattatatgt	atcatataac	1020
40	aataatgagc	acattgtagg	ttatccgaaa	gatggaaatg	cctttaataa	tcttgataga	1080
	attctaagag	taggttataa	tgccccagg	atccctcttt	ataaaaaaat	ggaagcagta	1140
	aaattgcgtg	atttaaaaa	ctattctgta	caacttaaat	tatatgatga	taaaaatgca	1200
45	tctrttaggac	tagtaggtac	ccataatgg	caaataggca	acgatccaaa	tagggatata	1260
	ttaattgcaa	gcaactggta	ctttaatcat	ttaaaagata	aaatrttagg	atgtgattgg	1320
50	tactrtgtac	ctacagatga	gggatggaca	aatgattaa			1359

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 332 628

② Nº de solicitud: 200702621

③ Fecha de presentación de la solicitud: **05.10.2007**

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ **Int. Cl.:** **A61K 38/08** (2006.01)
C07K 14/33 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	WO 2005025592 A2 (CENTRE NAT. RECH. SCIENT. y otros) 24.03.2005, páginas 5-6; ejemplos 1-2; reivindicaciones 17-25.	1-10
X	WO 9909057 A2 (INSTITUT PASTEUR) 25.02.1999, página 4, línea 10 - página 5, línea 11; página 10, línea 4 - página 11, línea 8; reivindicaciones 17-27.	1-10
X	EP 0057140 A2 (INSTITUT PASTEUR) 04.08.1982, página 5, línea 28 - página 6, línea 9; página 12, línea 22 - página 13, línea 27.	1-10
X	LARSEN, K.E. et al. "A glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF):tetanus toxin fragment C protein conjugate improves delivery of GDNF to spinal cord motor neurons in mice.", BRAIN RESEARCH, 2006, Vol. 1120, No. 1, páginas 1-12, Materiales y Métodos; Resultados.	1-10
X	BORDET, T. et al., "Neuronal targeting of cardiotrophin-1 by coupling with tetanus toxin C fragment.", MOLECULAR AND CELLULAR NEUROSCIENCE, 2001, Vol. 17, No. 5, páginas 842-854, Materiales y Métodos; Resultados.	1-10
X	FRANCIS, J.W. et al., "CuZn Superoxide Dismutase (SOD-1):Tetanus Toxin Fragment C Hybrid Protein for Targeted Delivery of SOD-1 to Neuronal Cells.", THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, 1995, Vol. 270, No. 25, páginas 15434-15442, Materiales y Métodos; Resultados.	1-10

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

27.01.2010

Examinador

J.L. Vizán Arroyo

Página

1/4

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

A61K, C07K

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

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

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 27.01.2010

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	SÍ
	Reivindicaciones 1-10	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	SÍ
	Reivindicaciones 1-10	NO

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

Base de la Opinión:

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

1. Documentos considerados:

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

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	WO2005025592 A2 (CENTRE NAT. RECH. SCIENT. Y OTROS)	24-03-2005
D02	WO9909057 A2 (INSTITUT PASTEUR)	25-02-1999
D03	EP0057140 A2 (INSTITUT PASTEUR)	04-08-1982
D04	Larsen, KE. et al., Brain Res., (2006), 1120(1): 1-12.	2006
D05	Bordet, T. et al., Mol. Cell. Neurosci., (2001), 17(5): 842-54.	2001
D06	Francis, J.W. et al., J. Biol. Chem., (1995), 270(25): 15434-42.	1995

Observaciones sobre documentos:

En D1-D6 se divulga el uso de un polipéptido que comprende el dominio carboxilo terminal de la subunidad pesada de la toxina tetánica (HcTeTx) para la elaboración de un medicamento, así como el correspondiente polinucleótido codificador de dicho polipéptido.

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

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

1.1. Reivindicaciones independientes 1 y 7.

En cualquiera de los documentos D1-D6 se describe una composición farmacéutica útil para el tratamiento de patologías que afectan al sistema nervioso central (SNC) que comprende una proteína de fusión caracterizada por contener el fragmento C no tóxico de la toxina tetánica, es decir, el extremo C-terminal de dicha proteína, y una construcción genética que codifica a dicha proteína de fusión (c.f. D1: páginas 5-6; ejemplos 1-2; reivindicaciones 17-25. D2: página 4, línea 10 - página 5, línea 11; página 10, línea 4 - página 11, línea 8; reivindicaciones 17-27. D3: página 5, línea 28 - página 6, línea 9, página 12, línea 22 - página 13, línea 27. D4-D6: Materiales y Métodos; Resultados). El objeto de la reivindicación 1 consiste en el uso de un polinucleótido para la elaboración de un medicamento que comprende la secuencia codificadora del dominio C-terminal de la subunidad pesada de la toxina tetánica. El objeto de la reivindicación 7 consiste en el uso del polipéptido codificado por el polinucleótido de la reivindicación 1 para la elaboración de un medicamento.

Por consiguiente, el objeto de protección de las reivindicaciones independientes 1 y 7 se considera que no es nuevo ni tiene actividad inventiva sobre la base de los documentos D1-D6. Según lo expuesto anteriormente, el objeto de las reivindicaciones dependientes 2-6, 8-10 también se considera que no es nuevo ni tiene actividad inventiva.

1.2. La presente solicitud no satisface el criterio establecido en el Art. 4.1. de la Ley de Patentes, pues el objeto de las reivindicaciones 1-10 no es nuevo ni tiene actividad inventiva de acuerdo con los Arts. 6.1. y 8.1. de la Ley de Patentes, respectivamente.