

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 412 955**

21 Número de solicitud: 201131503

51 Int. Cl.:

**A61K 31/352** (2006.01)

**A61P 29/00** (2006.01)

12

## SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

**16.09.2011**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**12.07.2013**

71 Solicitantes:

**UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE  
(50.0%)**

**Avda. de la Universidad, s/n  
03202 Elche (Alicante) ES y  
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES  
CIENTÍFICAS (50.0%)**

72 Inventor/es:

**BELMONTE MARTÍNEZ, Carlos;  
MESEGUER VIGUERAS, Víctor y  
VIANA DE LA IGLESIA, Félix**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

54 Título: **USO DE ANTAGONISTAS DEL RECEPTOR TRPA1 PARA EL TRATAMIENTO DE  
ENFERMEDADES ASOCIADAS A INFECCIONES BACTERIANAS.**

57 Resumen:

Uso de antagonistas del receptor TRPA1 para el tratamiento de enfermedades asociadas a infecciones bacterianas.

La presente invención se dirige al uso de un ligando antagonista del receptor TRPA1 para la preparación de un medicamento dirigido al tratamiento o prevención de enfermedades o disfunciones producidas por infecciones bacterianas o por exposición a endotoxinas bacterianas.

ES 2 412 955 A1

## **DESCRIPCION**

### **USO DE ANTAGONISTAS DEL RECEPTOR TRPA1 PARA EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES ASOCIADAS A INFECCIONES BACTERIANAS**

#### **5 CAMPO DE LA INVENCION**

La presente invención se relaciona con el uso de ligandos antagonistas de los receptores TRPA1 para la prevención y/o tratamiento de enfermedades ocasionadas por infecciones bacterianas o por exposición a endotoxinas bacterianas.

#### **10 ANTECEDENTES**

Las infecciones bacterianas se acompañan de dolor somático o visceral que se atribuye a la sensibilización de los nociceptores como consecuencia de la activación de respuestas inflamatorias. La capacidad patógena de las bacterias gram negativas, generalmente se asocia con ciertos componentes de su membrana externa, en particular, el lipopolisacárido (LPS), también conocido como endotoxina (Raetz C. y Whitfield C., Annu. Rev. Biochem., 2002, 71, 635–700). Cuando las bacterias son lisadas por las células del sistema inmunitario o por la acción de los antibióticos, el LPS se libera a nivel local y sistémico.

El LPS puede inducir varias reacciones potencialmente letales, incluyendo una fuerte estimulación de la respuesta inmune (Akira S. y Takeda K., Nat.Rev.Immunol.,2004, 4, 499-511; Poltorak A. y col., Science, 1998, 282, 2085-2088), la constricción de las vías respiratorias (Michel O. y col., Am. J. Respir. Crit. Care Med., 1996, 154, 1641-1646) y una vasodilatación arterial que puede llevar a una severa caída en la presión arterial (Landry D. W. y Oliver J. A., N.Engl.J.Med, 2001, 345, 588-595). Además, el LPS puede inducir síntomas de irritación y dolor que acompañan a muchas infecciones bacterianas tópicas y sistémicas. Cabe destacar que el dolor agudo y crónico es un síntoma muy frecuente en la meningitis, la pulpitis, el dolor de las heridas infectadas, cistitis bacteriana, la prostatitis crónica y el dolor abdominal crónico en el síndrome de intestino irritable post-infeccioso (Michel O. y col., Am. J. Respir. Crit. Care Med., 1996, 154, 1641-1646).

Además, el LPS puede ser adquirido por la exposición al aire contaminado, polvo orgánico y el polvo en los hogares, lo que influye en la exacerbación de los síntomas del asma (Michel O. y col., *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 1996, 154, 1641-1646). Incluso el humo de los cigarrillos contiene lipopolisacáridos, de los cuales aproximadamente el

5 1% persiste con capacidad bioactiva a la combustión, y se ha demostrado que fumar un paquete de cigarrillos diarios proporciona una dosis de LPS respirable que es comparable a los niveles de LPS que producen efectos adversos para la salud en trabajadores de la industria del algodón (Hasday y col., *Chest*, 1999, 115, 829-835). La exposición al LPS provoca una respuesta inflamatoria acompañada de hipersensibilidad

10 de las vías respiratorias, por lo que el LPS del humo del cigarrillo podría contribuir a la etiología y/o exacerbación de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) (Kharitonov y col., *Contrib. Microbiol.*, 2007, 14, 83-100). Además, podría contribuir a la patogénesis de la bronquitis crónica que se desarrolla en fumadores activos y pasivos (Hasday y col., *Chest*, 1999, 115, 829-835).

15 Por otra parte, hay que señalar que los diferentes tipos de LPS y lípidos A son demasiado tóxicos para su uso como adyuvante en vacunas humanas y se han hecho numerosos intentos para detoxificar el LPS sin afectar a su capacidad inmunogénica. En este sentido, un derivado de LPS, MPL (lípidos 3-O-desil-4'-monofosforilado), modificado a partir del LPS de la pared celular de la bacteria gram negativa *Salmonella*

20 *minnesota*, se usa como adyuvante en vacunas humanas comercializadas, debido a que presenta una menor capacidad proinflamatoria (Mata-Haro et al., *Science*, 2007, 15, 316, 1628-32).

Las dianas principales del LPS son las células presentadoras de antígeno (APC) del sistema inmune donde se activa el receptor tipo Toll 4 (TLR4). La activación del TLR4

25 supone la estimulación de una vía de señalización en APCs que es crítica para la liberación de citoquinas pro-inflamatorias (TNF-alfa, IL-1, IL-6). Estas citoquinas contribuyen a potenciar la respuesta inmune. Estudios recientes han documentado la expresión de TLR4 en neuronas (Wadachi y col., *J. Dent. Res.* 2006, 85, 49-53; Acosta y col., *J. Neurosci. Res.*, 2008, 86, 1077-86), pero hasta la fecha es una cuestión

30 pendiente si el LPS puede provocar directamente la excitación de las fibras nerviosas aferentes, y en particular, de las neuronas nociceptoras.

Las neuronas nociceptoras reconocen estímulos mecánicos, térmicos y químicos que pueden resultar dañinos para el organismo. Por ello, los nociceptores son considerados como guardianes de la integridad tisular, y la nocicepción como un mecanismo de seguridad esencial para la vida. A nivel molecular, los nociceptores poseen en sus  
5 terminales un conjunto de receptores proteicos que reconocen y transducen los estímulos nocivos de tipo físico (mecánicos, osmóticos y térmico) y químicos.

Los canales TRP (Receptores de Potencial Transitorio) constituyen una familia de receptores nociceptores subdivididos en 8 subfamilias: TRPC, TRPM, TRPV, TRPA, TRPP, TRPML, TRPN y TRPY. Estos receptores juegan un papel fundamental en la  
10 transducción de las distintas modalidades somatosensoriales en mamíferos, incluyendo la sensibilidad térmica, la recepción de feromonas, la regulación del tono vascular, la nocicepción y el dolor. Cada vez es más evidente que los canales TRP son muy importantes en la fisiología sensorial y que su alteración funcional, bien mediante mutaciones o por estímulos nocivos o factores pro-inflamatorios, conduce a estados  
15 patológicos en humanos.

En particular, el receptor TRPA1 es un canal iónico permeable de calcio no selectivo que regula el potencial de membrana modulando el flujo de cationes, no solo de calcio, sino también de otros iones como el sodio. Como otros miembros de la familia, los canales iónicos funcionales de TRPA1 se forman a través de la tetramerización de 4  
20 subunidades, cada una conteniendo seis dominios transmembrana, un ciclo de poro entre el dominio transmembrana 5 (S5) y 6 (S6) y N- y C-términos intracelulares. TRPA1 es expresado en neuronas sensoriales y co-localizado con marcadores de dolor tales como TRPV1, péptido relacionado con el gen calcitonina y receptor de bradiquinina (Corey D.P. y col, *Nature* 2004, 432, 723-730) En modelos de dolor, el  
25 bloqueo de la expresión de TRPA1 a través de antisentidos de gen específico ha evitado e invertido la hiperalgesia inducida por inflamación y daño a nervios (Obata, K. y col., *Journal of Clinical Investigation*, 2005, 115, 2393-2401). Además, el bloqueo de genes de TRPA1 altera la sensibilidad y evita la hipersensibilidad dolorosa evocada por bradiquinina (Kwan, K.Y. y col., *Neuron* 2006, 50, 277-289). Colectivamente, estos  
30 datos sugieren que TRPA1 juega un papel importante en las funciones sensoriales y los estados de dolor.

Como un canal iónico de compuerta de ligando, TRPA1 puede ser activado a través de una variedad de estímulos, incluyendo el frío nocivo, cationes de calcio intracelular, sustancias endógenas (por ejemplo bradiquinina), productos naturales pungentes (por ejemplo isotiocianato de arilo, o AITC), irritantes ambientales (por ejemplo, acroleína),  
5 moléculas anfipáticas (por ejemplo, trinitrofenol y clorpromazina) y agentes farmacéuticos (por ejemplo, URB597). La bradiquinina activa TRPA1 indirectamente a través de la vía de fosfolipasa C después de la unión de ésta a sus receptores. El trinitrofenol y la clorpromazina abren el canal iónico TRPA1 induciendo una curvatura o crenación en la membrana de la bicapa lipídica (Xu, H. y col., *Nat. Neurosci.*, 2006, 9,  
10 628-635). Más recientemente, se ha mostrado que los agonistas de TRPA1 pueden directamente interactuar con la proteína de canal. AITC y cinamaldehído modifican covalentemente varios residuos de cisteína y lisina localizados en el término N citoplásmico y activan dicho canal (Hinman, A. y col., *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 2006, 103, 19564-19568). Además, el catión calcio  
15 intracelular se une a los dominios del extremo EF de término N y media la abertura del canal (Zurborg, S. y col., *Nature Neuroscience*, 2007, 10, 277-279).

Todos estos hallazgos han revelado papeles fisiológicos potenciales de TRPA1, y también indican que la compuerta del canal iónico TRPA1 puede involucrar diferentes mecanismos y determinantes moleculares. De esta manera, la modulación de TRPA1  
20 puede tener muchas aplicaciones industriales y terapéuticas. En particular, diversos antagonistas de TRPA1 han sido descritos en el estado de la técnica como fármacos potencialmente adecuados en el tratamiento del dolor nociceptivo y neuropático.

Así, los documentos WO2009/089082, WO2009/147079 y WO2007/073505 describen el uso de distintos compuestos antagonistas de TRPA1 para el tratamiento del dolor,  
25 entre los que se menciona dolor crónico, dolor nociceptivo y dolor inflamatorio, así como de enfermedades pulmonares tales como asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica y constricción de bronquios. Por su parte, el documento US2010/0137259 describe el uso de isopentenil pirofosfato como agente inhibidor de la actividad del receptor TRPA1 para el tratamiento del dolor. Dicho dolor resulta de la activación del  
30 TRPA1 por estímulos como baja temperatura, un estímulo inflamatorio, un estímulo mecánico, etc. La solicitud WO2007/098252 hace referencia al uso de antagonistas en general de TRPA1 para el tratamiento de hiperalgesia, donde dichos antagonistas

bloquean específicamente la activación de TRPA1, suprimiendo o inhibiendo la quimiosensación, termosensación o mecanosensación nociva en un sujeto. Eid, S.R. y col. (*Mol. Pain*, 2008, 4, 48) muestran resultados del papel que juega el TRPA1 en los mecanismos responsables de la hipersensibilidad mecánica observada en modelos de dolor inflamatorio y neuropático, mediante la administración oral de HC- 030031, un conocido antagonista del TRPA1. El documento de Kunkler y col. (*Pain*, 2011, 152(1), 38-44) hace referencia al papel del TRPA1 en procesos inflamatorios neurogénicos mediados por CGRP, un péptido liberado por estimulación de neuronas trigeminales junto con la sustancia P. En particular, se demuestra en modelos de ratones que conocidos agonistas de TRPA1 e irritantes medioambientales estimulan la liberación de CGRP de las neuronas trigeminales y que esta liberación queda bloqueada por HC- 030031. Además, agonistas de TRPA1 aumentan también el flujo sanguíneo meníngeo tras su administración intranasal. La aplicación previa en venas durales de un antagonista de CGRP (CGRP 8-37) o la administración intranasal o dural de HC- 030031 bloquea el aumento en el flujo sanguíneo inducido por irritantes medioambientales. Con ello demuestran que la activación del receptor TRPA1 mediante irritantes medioambientales estimula la liberación del CGRP y aumenta el flujo sanguíneo en el cerebro lo que contribuye a la aparición de dolores de cabeza.

André E. y col. (*J. Clin. Invest.*, 2008, 118(7), 2574-82) identifican a los aldehídos  $\alpha,\beta$ -insaturados presentes en el humo de los cigarros como inductores de la inflamación neurogénica de las vías respiratorias mediante la estimulación de TRPA1, sugiriendo el papel de este receptor en la patogénesis de las enfermedades inducidas por el humo del tabaco. En este sentido, Caceres AI. y col. (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2009, 106(22), 9099-104) describen el papel del TRPA1 en la inflamación e hiperreactividad de las vías respiratorias en episodios de asma ocasionados por alérgenos y productos irritantes, y la capacidad del HC-030031 para inhibir la inflamación de eosinófilos y prevenir el desarrollo de la hiperreactividad de las vías respiratorias

En el documento de Pozsgai y col. (*Cardiovasc. Res.*, 2010, 87(4), 760-8) se describe cómo el TRPA1 media en la vasodilatación y puede ocasionar cambios en la presión sanguínea, evidenciando la relevancia patofisiológica del receptor TRPA1 en el sistema cardiovascular.

A pesar de los numerosos documentos que describen la utilidad terapéutica de los antagonistas de TRPA1, hasta la fecha no se ha descrito la capacidad de éstos para tratar enfermedades ocasionadas por infecciones bacterianas, en particular aquéllas producidas como consecuencia de la liberación de LPS a nivel local y sistémico.

5

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Los autores de la presente invención han identificado al receptor TRPA1 como una nueva diana molecular de los efectos de los lipopolisacáridos (LPS) de las bacterias gram negativas en el sistema nervioso periférico. Dichos efectos incluyen el incremento de la resistencia de las vías respiratorias, la vasodilatación de arterias y el dolor agudo e inflamatorio. Los resultados obtenidos indican que el LPS activa potencialmente el receptor TRPA1 y que este canal iónico media en gran parte la respuesta inducida por el LPS en neuronas nociceptoras.

Estos resultados resultan de gran relevancia en el desarrollo de alternativas para el tratamiento del dolor agudo e inflamatorio asociado a las infecciones bacterianas y para el tratamiento de las enfermedades pulmonares asociadas a la exposición de endotoxinas.

En particular, se han estudiado los efectos del LPS sobre el canal iónico TRPA1 de ratón y humano, sobreexpresado de forma heteróloga en las líneas celulares CHO (CHO-A1) y HEK293, encontrándose que la aplicación extracelular de LPS induce un aumento dosis-dependiente y reversible de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en células que expresan mTRPA1. La estimulación del TRPA1 por LPS fue confirmada mediante la técnica electrofisiológica “patch clamp”, observándose que la aplicación del LPS aumenta significativamente la amplitud de las corrientes registradas en células CHO-A1. Además se ha estudiado el efecto del LPS sobre el canal iónico TRPA1 expresado de forma nativa en neuronas sensoriales primarias de los ganglios nodoso y trigémino.

Con el fin de demostrar el papel del TRPA1 en los efectos causados por el LPS, se han efectuado ensayos *in vivo* y *ex vivo* que han puesto de manifiesto que el TRPA1 contribuye a los cambios funcionales en la ventilación pulmonar, a la vasodilatación de arterias mesentéricas y al dolor agudo e inflamatorio inducidos por LPS de *E. coli*.

Se ha demostrado además que la administración de antagonistas del receptor TRPA1 inhibe de forma significativa estos efectos. Por tanto, estos resultados han puesto de manifiesto la utilidad de los compuestos antagonistas o inhibidores de la actividad del receptor TRPA1 para el tratamiento de enfermedades asociadas a infecciones bacterianas inducidas por LPS o a la exposición a endotoxinas bacterianas.

- Así, la invención se dirige al uso de un inhibidor de TRPA1 o de un inhibidor de una variante funcionalmente equivalente de dicha proteína, en la preparación de un medicamento dirigido al tratamiento o prevención de enfermedades o disfunciones producidas por infecciones bacterianas o por exposición a endotoxinas bacterianas
- En una realización particular, dichas infecciones bacterianas son causadas por los lipopolisacáridos procedentes de la membrana externa de la bacteria *Escherichia coli*.

## DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

**Figura 1 .** (A, B y C) Ejemplos de los efectos del LPS (10  $\mu\text{g/ml}$ ) sobre la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  en neuronas disociadas de ganglio nodoso, y procedentes de ratones WT (A), *Tlr4* KO (B) y *Trpa1* KO (C). El cinamaldehído (CA, 100  $\mu\text{M}$ ) y la capsaicina (Caps, 100 nM) se aplicaron para identificar células que expresan TRPA1 y TRPV1, respectivamente. (D) Porcentaje de neuronas sensoriales del nodoso y trigeminales que responden al LPS (azul), CA (rojo), o ambos (púrpura). Las etiquetas ‘WT + HC’ y ‘WT after HC’ se refieren a las respuestas del LPS (10  $\mu\text{g/ml}$ ) observadas en presencia de HC-030031, y tras interrumpir su aplicación, respectivamente. (E) Ejemplo del efecto del LPS sobre la frecuencia de disparo de una fibra nociceptora polimodal de ratón. Calor (42°C), frío (15°C), LPS (200  $\mu\text{g/ml}$ ), MO (100  $\mu\text{M}$ ) y capsaicina (5  $\mu\text{M}$ ) se aplicaron durante los periodos indicados con las correspondientes barras. (F) Frecuencia media de disparo de fibras nociceptoras registradas en presencia del LPS o MO, normalizadas con respecto al valor medio registrado en control (\*  $p < 0.05$  y \*\*  $p < 0.01$ ,  $n = 11$ ).

**Figura 2.** (A) Registro fluorimétrico de calcio intracelular, en el que se muestra el efecto del LPS sobre células CHO-A1. En este experimento, el 46 % de las células que expresan TRPA1 (sensibles a la aplicación de MO) respondieron al LPS (trazos negros,  $n = 25$ ). Las células CHO-A1 que no respondieron al LPS (trazos azules,  $n = 29$ ) mostraron respuestas más pequeñas a MO. Las células que no respondieron a MO



(trazos rojos) tampoco respondieron al LPS ( $n = 12$ ). Los trazos continuos representan las medias y los trazos punteados representan las medias  $\pm$  el correspondiente SEM. (B), Curva dosis-respuesta de los incrementos de  $[Ca^{2+}]_i$  evocados por el LPS ( $>80$  células por cada punto). La curva sigmoidal representa el ajuste a la ecuación de Hill. (C) Curso temporal de la corriente mediada por TRPA1 en respuesta a la aplicación de LPS y MO, monitorizada a  $-75$  y  $+75$  mV. Los puntos coloreados corresponden a los trazos de corriente mostrados en el panel derecho. (D) Valor promedio de la amplitud máxima de las corrientes (normalizadas con respecto al control) durante la aplicación extracelular de LPS ( $20 \mu\text{g/ml}$ ) sobre células CHO-A1 ( $n = 7$ ) y células CHO control (mock,  $n = 6$ ) ( $T = 25^\circ\text{C}$ ). (E) Columna a la izquierda, amplitud máxima de las corrientes mediadas por TRPA1 (normalizadas respecto de la corriente control) en presencia de  $20 \mu\text{g/ml}$  de LPS ( $n = 4$ ). En otra serie experimental, los efectos del LPS se evaluaron tras la pre-aplicación de HC030031 (HC + LPS), después del lavado del HC030031 (LPS, wash HC) y la posterior aplicación de HC030031 (LPS + HC) ( $n = 5$ ,  $T = 33^\circ\text{C}$ ). Las diferencias estadísticamente significativas se indican con un asterisco ( $p < 0.05$ ) o dos asteriscos ( $p < 0.01$ ).

**Figura 3.** (A) Corrientes mediadas por TRPA1 en células CHO-A1 en respuesta a un protocolo de pulsos de voltaje en control y en presencia de LPS de *E. coli*. ( $20 \mu\text{g/ml}$ ) (B) Valor promedio de la dependencia de voltaje de las corrientes de cola mediadas por TRPA1 y monitorizadas a  $-75$  mV en control y en presencia de  $20 \mu\text{g/ml}$  de LPS ( $n = 6$ ). Los datos se normalizaron con respecto al valor obtenido a  $+175$  mV en control. Las curvas representan el ajuste de los datos a una función de Boltzmann (C) Elevación media de  $[Ca^{2+}]_i$  en células CHO-A1 en respuesta a trinitrofenol, LPS en solución control y LPS en presencia de trinitrofenol. (D) Registro fluorimétrico de la  $[Ca^{2+}]_i$  que muestra el efecto de la aplicación extracelular de Lípido A sobre células CHO-A1. El 36% de las células que expresan TRPA1 (sensibles a MO) respondieron al Lípido A (trazos negros,  $n = 50$ ). Las células que expresan TRPA1 y fueron insensibles al Lípido A (trazos rojos,  $n = 87$ ) mostraron respuestas más pequeñas a MO. Las células no transfectadas (trazos azules) no respondieron al Lípido A ( $n = 20$ ). Los trazos continuos representan las medias y los trazos punteados representan las medias  $\pm$  el correspondiente SEM. (E) Elevación promedio de la  $[Ca^{2+}]_i$  evocada por extractos de LPS de *E. coli*, *S. marcescens* y *N. meningitidis* ( $20 \mu\text{g/ml}$ ) en células CHO-A1 ( $n > 25$

para cada trazo). (F) Amplitud promedio de la  $[Ca^{2+}]_i$  evocada por varios LPS con lípido A de diferente conformación en células CHO-A1 ( $n = 26-129$ ).

**Figura 4.** (A) Efectos de un aerosol de LPS (15 min, 100  $\mu\text{g/ml}$  en HBSS) sobre el Penh en ratones WT ( $n = 6$ ) y *Trpa1* KO ( $n = 6$ ). Las líneas continuas representan el valor promedio y las bandas coloreadas representan el correspondiente rango de promedio  $\pm$  SEM. (B y C) Promedio de los incrementos relativos de la pausa inspiratoria (EIP) y de la pausa espiratoria (EEP) inducidos por el aerosol de LPS. (D) Resumen del efecto de una perfusión de LPS (100  $\mu\text{g/ml}$ ) sobre el diámetro de arterias mesentéricas de ratones WT y *Trpa1* KO en condición control y en presencia de HC-030031 (10  $\mu\text{M}$ ). Las arterias fueron pre-contráidas con el agonista beta adrenérgico fenilefrina (2  $\mu\text{M}$ ). (E) Resumen de los efectos de la inyección intraplantar de LPS (5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  in 10  $\mu\text{l}$ ) en la respuesta nociceptiva de ratones WT y *Trpa1* KO con dos diferentes fondos genéticos. (F) Umbral de fuerza mecánica necesaria para la retirada de la pata en respuesta a estimulación mecánica, antes y después de la inyección intraplantar de LPS (5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ). (G) Correlación entre la inflamación producida en la pata por varios LPS de diferentes formas (azul y rojo para cilíndrico, y negro para cónico;  $n = 5-9$ ) con la potencia de activación de TRPA1 (estimada de la amplitud de la respuesta de  $Ca^{2+}$  evocada en células CHO-A1; Fig. 3E). El triángulo vacío representa la inflamación inducida por el LPS de *E. coli* en ratones *Trpa1* KO ( $n = 4$ ).

20

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Los autores de la presente invención han encontrado de forma sorprendente que los lipopolisacáridos (LPS) presentes en bacterias gram negativas activan los receptores TRPA1 y que esta activación provoca un aumento dosis-dependiente y reversible de la concentración de  $Ca^{2+}$  en células que expresan mTRPA1. Además, este efecto puede evitarse mediante el empleo de antagonistas de los receptores TRPA1.

Este hallazgo abre la posibilidad de terapias mejoradas para enfermedades ocasionadas por infecciones bacterianas o por exposición a endotoxinas bacterianas mediante el uso de inhibidores o antagonistas del receptor TRPA1.

Por tanto, en un primer aspecto, la invención se refiere al uso de un inhibidor de TRPA1 o de un inhibidor de una variante funcionalmente equivalente de dicha proteína, en la

preparación de un medicamento dirigido al tratamiento o prevención de enfermedades o disfunciones producidas por infecciones bacterianas o por exposición a endotoxinas bacterianas. Alternativamente, la invención se relaciona con un inhibidor de TRPA1 o con un inhibidor de una variante funcionalmente equivalente de TRPA1 para su uso en

5 el tratamiento o prevención de enfermedades o disfunciones producidas por infecciones bacterianas o por exposición a endotoxinas bacterianas. Alternativamente, la invención se relaciona con un método para el tratamiento o prevención de enfermedades o disfunciones producidas por infecciones bacterianas o por exposición a endotoxinas bacterianas que comprende la administración a un sujeto que la necesita de una

10 composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor del receptor TRPA1 o de un inhibidor de una variante funcionalmente equivalente de TRPA1.

Aunque puede tratarse una variedad de sujetos, se prefiere particularmente que el sujeto sea un ser humano.

15 El término “TRPA1”, “receptor TRPA1”, “proteína TRPA1” y “canal iónico TRPA1” se utilizan de forma indistinta en la presente invención. Dichos términos se refieren a un canal iónico permeable de calcio no selectivo, perteneciente a la familia de los receptores de potencial transitorio (TRP), que regula el paso de cationes como el calcio y el sodio a través de la membrana celular. La activación de este canal iónico permite el

20 paso de los cationes extracelulares al citoplasma a través del mismo, lo que conlleva la despolarización de la membrana celular de las neuronas sensoriales y contribuye de este modo a la generación de potenciales de acción que finalmente se transmiten al cerebro para reconocer, entre otros, el dolor.

Como otros miembros de la familia, los canales iónicos TRPA1 funcionales se forman a

25 través de la tetramerización de 4 subunidades, cada uno conteniendo seis dominios transmembrana, un ciclo de poro entre el dominio transmembrana 5 (S5) y 6 (S6) y N- y C-términos intracelulares.

Proteínas TRPA1 adecuadas para su uso en la presente invención incluyen, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO:1, o un polipéptido equivalente

30 o un fragmento bioactivo funcional de las mismas. El TRPA1 incluye también polipéptidos que mantienen una función del TRPA1 y comprenden: (i) toda o una porción de la secuencia de aminoácidos definido como SEQ ID NO:1; (ii) la secuencia

de aminoácidos definida como SEQ ID NO:1 con 1 a 2, 3, 5, 7, 10, 15, 20, 30, 50, 75 o más sustituciones de aminoácidos; (iii) una secuencia de aminoácidos que es al menos 70%, 75%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ó 99% idéntica a la secuencia definida como SEQ ID NO:1; o (iv) fragmentos funcionales de la misma. Estos polipéptidos  
 5 también incluyen homólogos, por ejemplo ortólogos y parálogos, de la secuencia definida como SEQ ID NO:1.

El término “TRPA1” se refiere también a un ácido nucleico que codifica un polipéptido de la invención, por ejemplo, un ácido nucleico que comprende una secuencia consistente en, o sustancialmente consistente en, una secuencia polinucleótida definida  
 10 como SEQ ID NO:2 que codifica para la proteína definida en el párrafo anterior. Tanto si se especifica de forma explícita o no en la presente invención, un experto en la materia entendería fácilmente si TRPA1 se refiere a un ácido nucleico o a una proteína.

Asimismo, la invención contempla el uso de inhibidores de variantes funcionalmente equivalentes de dichas proteínas. Por “variante funcionalmente equivalente” se entiende  
 15 todos aquellos polipéptidos derivados de la secuencia de TRPA1 mediante modificación, inserción y/o delección de uno o más aminoácidos, siempre y cuando se mantenga sustancialmente la función de la proteína TRPA1.

Variantes funcionalmente equivalentes de TRPA1 incluyen aquellas que muestran al menos un 25%, al menos 40%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos  
 20 90%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia con respecto a las secuencias de TRPA1 indicadas anteriormente. El grado de identidad entre dos secuencias de aminoácidos puede determinarse por métodos convencionales, por ejemplo, mediante algoritmos estándar de alineamiento de secuencias conocidos en el estado de la técnica, tales como, por  
 25 ejemplo BLAST (Altschul S.F. et al. Basic local alignment search tool. J Mol Biol. 1990; 215(3):403-10). El experto en la materia entenderá que las secuencias de aminoácidos a las que se hace referencia en esta descripción pueden estar modificadas químicamente, por ejemplo, mediante modificaciones químicas que son fisiológicamente relevantes, tales como, fosforilaciones, acetilaciones, etc.

30 Tal como se usa en el presente documento, los términos “tratar”, “tratamiento” y “de tratamiento” se refieren a la mejora de uno o más síntomas asociados con una enfermedad que resulta de la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de

la composición de la invención o una preparación farmacéutica que comprende la misma, a un sujeto que necesita dicho tratamiento. Por tanto, “tratamiento” tal como se usa en el presente documento cubre cualquier tratamiento de una enfermedad, un trastorno o un estado de un mamífero, particularmente un ser humano, e incluye: (a) 5 prevenir que la enfermedad o el estado se produzca en un sujeto que puede estar predispuesto a la enfermedad o el estado pero no se ha diagnosticado aún que la/lo tiene; (b) inhibir la enfermedad o el estado, es decir, detener su desarrollo; o (c) aliviar la enfermedad o el estado, es decir, provocar la regresión de la enfermedad o el estado o la mejora de uno o más síntomas de la enfermedad o el estado. La población de sujetos 10 tratados mediante el método incluye un sujeto que padece el estado o la enfermedad indeseable, así como sujetos en riesgo de desarrollar el estado o la enfermedad. Por tanto, un experto en la técnica comprende que un tratamiento puede mejorar el estado del paciente, pero puede no ser una cura completa de la enfermedad. Tal como se usa en el presente documento, los términos “trastorno” y “enfermedad” se usan de manera 15 intercambiable para referirse a un estado anómalo o patológico en un sujeto que altera funciones corporales y puede ser mortal.

La frase “cantidad terapéuticamente eficaz” se usa en el presente documento para querer decir una cantidad suficiente para evitar y preferiblemente reducir en al menos aproximadamente el 25 por ciento, más preferiblemente en al menos el 50 por ciento, 20 los más preferiblemente en al menos el 90 por ciento, un cambio clínicamente significativo en una característica de la patología. En lo que se refiere a la presente invención, la expresión también puede significar una cantidad suficiente para mejorar o revertir uno o más síntomas asociados con una enfermedad ocasionada por una infección bacteriana o por exposición a endotoxinas bacterianas. En particular, una 25 “cantidad terapéuticamente eficaz” del tratamiento puede dar como resultado la mejora, reducción o eliminación de al menos uno de los siguientes síntomas: dolor agudo, dolor crónico, dolor nociceptivo, dolor inflamatorio, constricción e inflamación de las vías respiratorias, e hipotensión asociada al shock séptico. Cuando se aplica el principio activo a un individuo, administrado solo, la expresión se refiere a ese principio solo. 30 Cuando se aplica en una combinación, la expresión se refiere a cantidades combinadas de los principios activos que dan como resultado el efecto terapéutico, ya se administre en combinación, en serie o de manera simultánea

El término “sujeto” se refiere a un animal, preferiblemente un mamífero incluyendo un no primate (por ejemplo una vaca, un cerdo, un caballo, un gato, un perro, una rata o un ratón) y un primate (por ejemplo un mono o un ser humano). En una realización preferida, el sujeto es un perro. En una realización más preferida, el sujeto es un primate  
 5 que, en una realización todavía más preferida, dicho primate es un ser humano.

#### Inhibidores del receptor TRPA1

El término “inhibidor de TRPA1” o “inhibidores de una variante funcionalmente equivalente de TRPA1”, según se usa en la presente invención, se refiere a cualquier  
 10 compuesto que puede provocar una disminución en la actividad del TRPA1, incluyendo aquellos compuestos que evitan la expresión del gen de TRPA1, lo que conduce a una reducción de los niveles de proteína o de ARNm de TRPA1, así como compuestos que inhiben TRPA1, lo que provoca una disminución en el flujo de cationes ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ , etc.) a través del canal. En una realización particular, el inhibidor del receptor TRPA1 es un  
 15 antagonista o bloqueante de TRPA1. Un “antagonista o bloqueante de TRPA1” tal como se usa en el presente documento se refiere a cualquier compuesto que puede unirse a la molécula de TRPA1, o bien dentro del poro o bien en otra parte del receptor importante para la función del receptor tal como sus sitios de fosforilación. La unión del compuesto bloquearía entonces el flujo de los cationes a través del receptor TRPA1. Si  
 20 el bloqueante actúa como un antagonista, el compuesto bloquearía o reduciría una respuesta mediada por agonistas. La unión de antagonistas interrumpirá la interacción e inhibirá la función de un agonista o agonista inverso en receptores. Los antagonistas median sus efectos mediante la unión a un sitio activo o a sitios alostéricos en receptores o pueden interaccionar en sitios de unión únicos que normalmente no están  
 25 implicados en la regulación biológica de la actividad del receptor. La actividad antagonista puede ser reversible o irreversible dependiendo de la longevidad del complejo antagonista-receptor, que, a su vez, depende de la naturaleza de la unión de receptor y antagonista.

Pueden identificarse compuestos que conducen a la inhibición del receptor TRPA1  
 30 usando ensayos convencionales tales como métodos para medir el flujo de cationes (por ejemplo  $\text{Ca}^{2+}$ ) a través del canal, usando métodos electrofisiológicos convencionales y ensayos de unión a receptor.

Otros métodos adecuados para la determinación de aquellos compuestos que son inhibidores de TRPA1 comprenden tanto los métodos basados en la determinación de los niveles de TRPA1 o de ARNm que codifica TRPA1.

Así, en una forma de realización particular de la invención, los niveles de expresión de TRPA1 se determinan midiendo los niveles de expresión del ARNm que codifican para la proteína TRPA1. Para este fin, la muestra biológica se puede tratar para disgregar de forma física o mecánica la estructura del tejido o célula, para liberar los componentes intracelulares en una solución acuosa u orgánica para preparar los ácidos nucleicos para análisis adicionales. Los ácidos nucleicos se extraen de la muestra mediante procedimientos conocidos para el experto en la materia y disponibles comercialmente. El ARNm se extrae después a partir de muestras congeladas o recientes mediante cualquiera de los métodos típicos en la técnica, por ejemplo Sambrook, J., et al., 2001 Molecular Cloning, a Laboratory Manual, 3ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y., Vol. 1-3. Preferiblemente, se aportan todos los avances conocidos para evitar la degradación del ARN durante el proceso de extracción.

La cantidad de ARNm que codifica TRPA1 puede ser determinada, por ejemplo, mediante ensayos de hibridación o de amplificación que incluyen, sin limitación, ensayos de Northern y Southern Blot y reacción en cadena de polimerasa (PCR). Un método para la detección del ARNm específico para TRPA1 incluye el uso de sondas que son capaces de hibridar específicamente con el ARNm o ADNc de TRPA1. La sonda puede ser un ADNc de cadena completa o un fragmento del mismo, como por ejemplo un oligonucleótido de al menos 7, 15, 30, 50, 100, 250 o 500 nucleótidos de longitud capaz de hibridar con el ARNm o ADNc diana en condiciones estrictas. Preferiblemente, la detección del ARNm se lleva a cabo tras la amplificación del ADNc obtenido a partir del ARNm usando técnicas de amplificación conocidas, tales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), reacción en cadena de polimerasa en tiempo real ("RT-PCR"), reacción en cadena de ligasa ("LCR"), replicación de secuencias auto-sostenida ("3SR") también conocida como amplificación basada en secuencias de ácidos nucleicos ("NASBA"), amplificación Q-B-Replicasa, amplificación por círculo rodante ("RCA"), amplificación mediada por transcripción ("TMA"), amplificación asistida por enlazadores ("LADA"), amplificación por desplazamiento múltiple ("MDA"), amplificación por desplazamiento de la cadena y del invasor ("SDA").

Por otro lado, el nivel de la proteína TRPA1 puede ser cuantificado mediante cualquier método convencional que permita detectar y cuantificar dicha proteína en una muestra de un sujeto. A modo ilustrativo, no limitativo, los niveles de dicha proteína pueden cuantificarse, por ejemplo, mediante el empleo de anticuerpos con capacidad de unirse a TRPA1 (o a fragmentos de la misma que contengan un determinante antigénico) y la posterior cuantificación de los complejos formados. Los anticuerpos que se emplean en estos ensayos pueden estar marcados o no. Ejemplos ilustrativos de marcadores que se pueden utilizar incluyen isótopos radiactivos, enzimas, fluoróforos, reactivos quimioluminiscentes, sustratos enzimáticos o cofactores, inhibidores enzimáticos, partículas, colorantes, etc. Existe una amplia variedad de ensayos conocidos que se pueden utilizar en la presente invención, que utilizan anticuerpos no marcados (anticuerpo primario) y anticuerpos marcados (anticuerpo secundario); entre estas técnicas se incluyen el Western-blot o transferencia Western, ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima), RIA (radioinmunoensayo), EIA competitivo (inmunoensayo enzimático competitivo), DAS-ELISA (ELISA sandwich con doble anticuerpo), técnicas inmunocitoquímicas e inmunohistoquímicas, técnicas basadas en el empleo de biochips o microarrays de proteínas que incluyan anticuerpos específicos o ensayos basados en precipitación coloidal en formatos tales como dipsticks. Otras maneras para detectar y cuantificar dicha proteína TRPA1, incluyen técnicas de cromatografía de afinidad, ensayos de unión a ligando, etc.

La inmunotransferencia se basa en la detección de proteínas previamente separadas mediante electroforesis en gel en condiciones desnaturalizantes e inmovilizadas en una membrana, generalmente nitrocelulosa o PVDF (Polivinilidenofluoruro), mediante incubación con un anticuerpo específico y un sistema de revelado (por ejemplo, quimioluminiscencia). El análisis mediante inmunofluorescencia requiere el uso de un anticuerpo específico para la proteína diana para el análisis de la expresión. El ELISA está basado en el uso de antígenos o anticuerpos marcados con enzimas de modo que los conjugados formados entre el antígeno diana y el anticuerpo marcado dan como resultado la formación de complejos enzimáticamente activos. Puesto que uno de los componentes (el antígeno o el anticuerpo marcado) están inmovilizados sobre un soporte, los complejos antígeno-anticuerpo están inmovilizados sobre el soporte y de esta manera, se pueden detectar mediante la adición de un sustrato que es convertido por



la enzima en un producto que es detectable mediante, por ejemplo, espectrofotometría o fluorometría.

Cuando se usa un método inmunológico, se puede usar cualquier anticuerpo o reactivo que se sabe se une a TRPA1 con una afinidad suficientemente elevada como para  
5 detectar la cantidad de proteínas diana. Sin embargo, se prefiere el uso de un anticuerpo, por ejemplo sueros policlonales, sobrenadantes de hibridomas o anticuerpos monoclonales, fragmentos de anticuerpos, Fv, Fab, Fab' y F(ab')<sub>2</sub>, scFv, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos y anticuerpos humanizados.

Por otra parte, la determinación de los niveles de expresión de proteínas se puede llevar  
10 a cabo mediante técnicas de inmunohistoquímica bien conocidas en el estado de la técnica. Para llevar a cabo la determinación mediante inmunohistoquímica, la muestra puede ser una muestra fresca, congelada y embebida en material plástico, o fresca embebida en parafina y fijada usando un agente protector del tipo de la formalina. Para la determinación inmunohistoquímica, la muestra se tiñe con un anticuerpo específico  
15 para TRPA1 y se determina la cantidad de células que se han teñido y la intensidad de la tinción. Típicamente, se asigna a la muestra un valor indicativo de la expresión total y que se calcula en función de la frecuencia de células teñidas (valor que varía entre 0 y 4) y de la intensidad en cada una de las células teñidas (valor variable entre 0 y 4). Criterios típicos para asignar valores de expresión a las muestras se han descrito en  
20 detalle, por ejemplo, en Handbook of Immunohistochemistry e In Situ Hybridization in Human Carcinomas, M. Hayat Ed., 2004, Academic Press. Preferiblemente, la detección inmunohistoquímica se lleva a cabo en paralelo con muestras de células que sirven como marcador positivo y como marcador negativo. También es frecuente usar un control de fondo.

25 En aquellos casos en los que se desee analizar un elevado número de muestras, es posible la utilización de formatos matriciales y/o procedimientos automatizados. En una forma de realización, es posible el uso de micromatrices de tejidos (Tissue Microarrays o TMA) que pueden ser obtenidos usando distintas técnicas. Las muestras que forman parte de las micromatrices pueden ser analizadas de distinta manera incluyendo  
30 inmunohistoquímica, hibridación in situ, PCR in situ, análisis de ARN o de ADN, inspección morfológica y combinaciones de cualquiera de las anteriores. Métodos para el procesamiento de micromatrices de tejido han sido descritos, por ejemplo, en

Kononen, J. et al., (Nat. Med. 1987, 4:844-7). Las micromatrices de tejido se preparan a partir de núcleos cilíndricos de 0,6 a 2 mm de diámetro a partir de muestras de tejido embebidas en parafina y vueltas a embeber en un único bloque receptor. De esta forma, el tejido procedente de múltiples muestras puede ser insertado en un único bloque de parafina.

Por “niveles de ARNm o proteína TRPA1 disminuidos” en relación con los niveles de ARNm o proteína en una muestra de referencia, se entiende, según la presente invención, una disminución en los niveles de ARNm o proteína de al menos 1,1 veces, 1,5 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 60 veces, 70 veces, 80 veces, 90 veces, 100 veces o incluso más con respecto a la muestra control del sujeto. Por “niveles de referencia o control”, según la presente invención, se entienden los niveles de ARNm o proteína de TRPA1 que presenta el sujeto antes de administrarle los inhibidores de TRPA1 o al que se le administran inhibidores controles que no inhiben TRPA1.

La determinación de las capacidades de inhibición o bloqueo del compuesto sobre la actividad biológica del receptor TRPA1 puede detectarse usando los ensayos convencionales descritos anteriormente.

Las capacidades de bloqueo pueden expresarse como la afinidad del inhibidor, la potencia del inhibidor o la especificidad de dicho inhibidor.

La afinidad de un fármaco se calcula usando la constante de disociación en equilibrio del complejo receptor-fármaco, KD. KD es la razón de las constantes de velocidad para la reacción inversa (k2) y directa (k1) entre el fármaco y el receptor y el complejo fármaco-receptor. KD es también la concentración de fármaco a la que la ocupación del receptor es la mitad de la máxima. Los fármacos con una KD alta (baja afinidad) se disocian rápidamente de los receptores; por el contrario, los fármacos con una KD baja (alta afinidad) se disocian lentamente de los receptores. La afinidad de un fármaco para un receptor describe la avidez con la que el fármaco se une al receptor (es decir, la KD). La afinidad puede medirse usando técnicas de unión en equilibrio tales como las descritas por Kessler *et al.* (Kessler M *et al.*, Molecular Pharmacology enero de 1996 vol. 49 n.º 1:123-131).

En una realización preferida, el inhibidor del receptor TRPA1 tiene una KD de entre 0,001 nM y 10  $\mu$ M, preferiblemente entre 0,01 nM y 1  $\mu$ M, preferiblemente entre 0,01 nM y 100 nM, preferiblemente entre 0,1 nM y 10 nM.

La potencia se refiere a la concentración (CE50) o dosis (DE50) de un fármaco  
5 requerida para producir el 50% del efecto máximo del fármaco.  
(<http://www.ncgc.nih.gov/guidance/section3.html>). CE50 es igual a KD cuando existe una relación lineal entre la ocupación y la respuesta. Con frecuencia, la amplificación de la señal se produce entre la respuesta y la ocupación del receptor, lo que da como resultado que la CE50 para una respuesta sea mucho menor (es decir, colocada a la  
10 izquierda en el eje de abscisa de la curva de dosis-respuesta logarítmica) que la KD para la ocupación del receptor. La potencia depende tanto de la afinidad de un fármaco para su receptor, como de la eficacia con la que la interacción fármaco-receptor se acopla a la respuesta. La dosis de fármaco requerida para producir un efecto está inversamente relacionada con la potencia. En general, es importante una baja potencia sólo si da como  
15 resultado la necesidad de administrar el fármaco en grandes dosis que son poco prácticas. La DE50 para una relación dosis-respuesta cuantitativa es la dosis a la que el 50% de individuos muestra el efecto cuantitativo especificado. En una realización preferida, el inhibidor del receptor TRPA1 tiene una CI50 de entre 0,001 nM y 10  $\mu$ M, preferiblemente entre 0,01 nM y 1  $\mu$ M, preferiblemente entre 0,1 nM y 100 nM,  
20 preferiblemente entre 0,1 nM y 10 nM.

La eficacia (también denominada actividad intrínseca) de un fármaco es la capacidad del fármaco para provocar una respuesta cuando se une al receptor. En algunos tejidos, los agonistas que demuestran alta eficacia pueden dar como resultado un efecto máximo, incluso cuando sólo una pequeña fracción de los receptores está ocupada. La  
25 eficacia no está asociada a la potencia de un fármaco.

La concentración inhibidora media o CI50 es la concentración de un antagonista que reduce una respuesta especificada hasta el 50% del efecto máximo posible.

La especificidad superior de un compuesto por una molécula definida se refiere a la capacidad del compuesto para inhibir la molécula definida de una manera  
30 sustancialmente superior con respecto a la capacidad del compuesto para inhibir otra molécula.

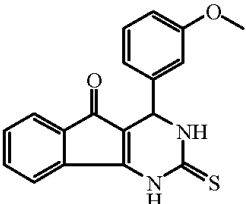
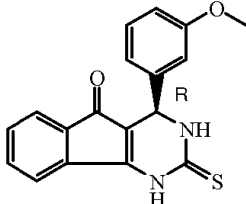
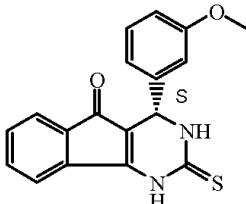
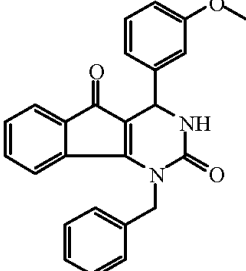
En una realización preferida, el inhibidor es un inhibidor del receptor TRPA1 selectivo.

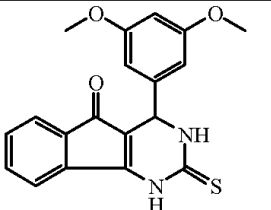
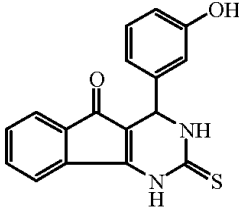
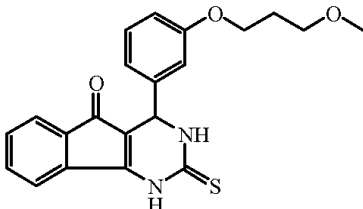
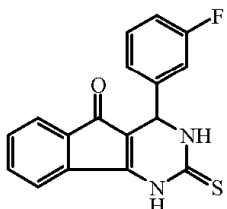
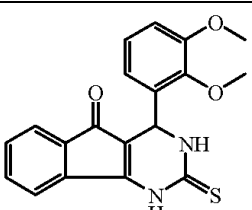
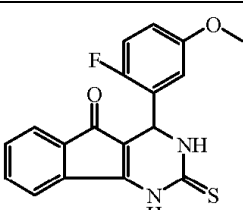
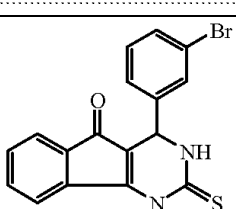
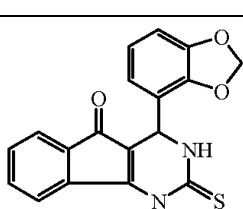
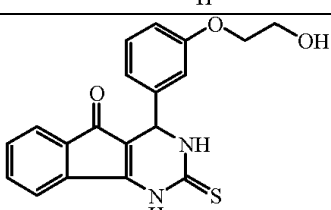
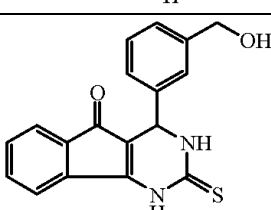
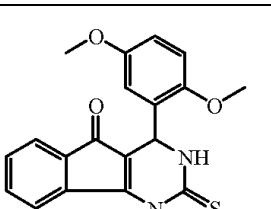
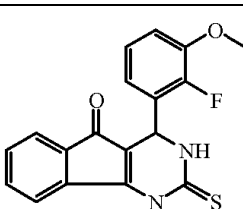
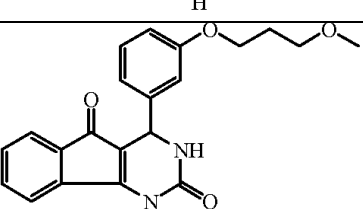
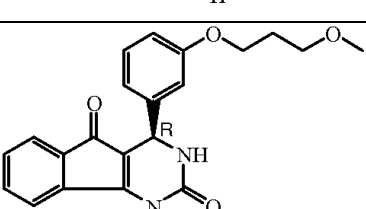
La expresión “inhibidor del receptor TRPA1 selectivo” se refiere a un compuesto que puede inhibir la actividad del receptor TRPA1 mientras que no inhibe de manera sustancial la actividad de al menos un receptor de la misma familia (tales como los receptores de TRPC6, TRPV5, TRPV6, TRPM8, TRPV1, TRPV2, TRPV3 o TRPV4)) o una molécula de una familia diferente a la misma concentración de compuesto. Por ejemplo, un inhibidor del receptor TRPA1 selectivo puede tener una actividad inhibidora del receptor TRPA1, que sea 2, 5, 10, 20, 50, 100, 500 ó 1000 veces más potente que su actividad inhibidora de TRPV1. En ciertas realizaciones, la actividad inhibidora de un inhibidor del receptor TRPA1 selectivo es al menos 5 veces, 10 veces o 20 veces más potente que la actividad inhibidora para otra molécula tal como TRPV1 del compuesto.

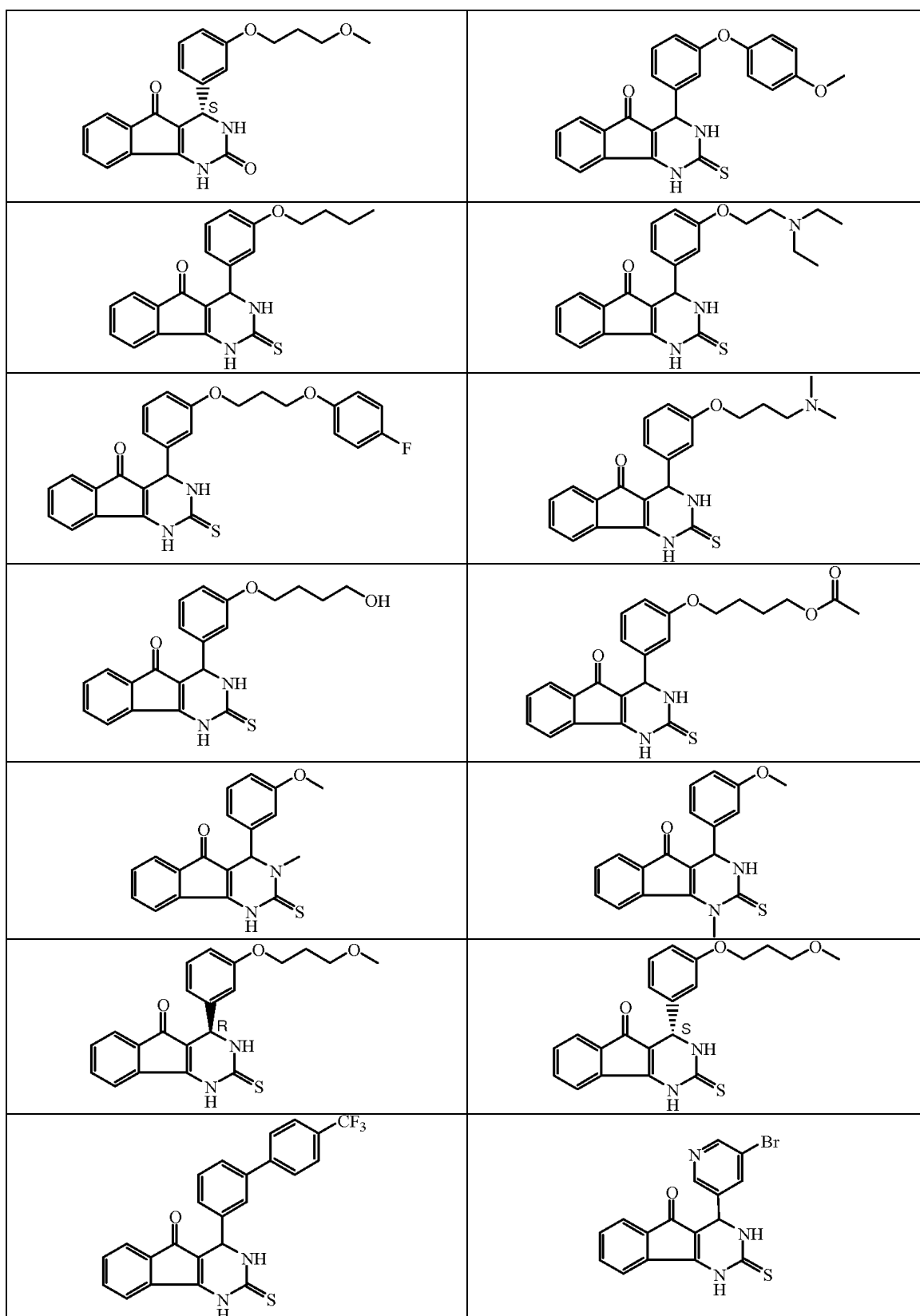
Inhibidores del receptor TRPA1 a modo de ejemplo, no limitativos que pueden usarse en el tratamiento de una enfermedad ocasionada por una infección bacteriana o por exposición a endotoxinas bacterianas, según la presente invención, se describen en la tabla I o en los documentos de patente WO2007/073505, WO2007/098252, WO2009/147079, US2010/0137259 y WO 2009089082A1.

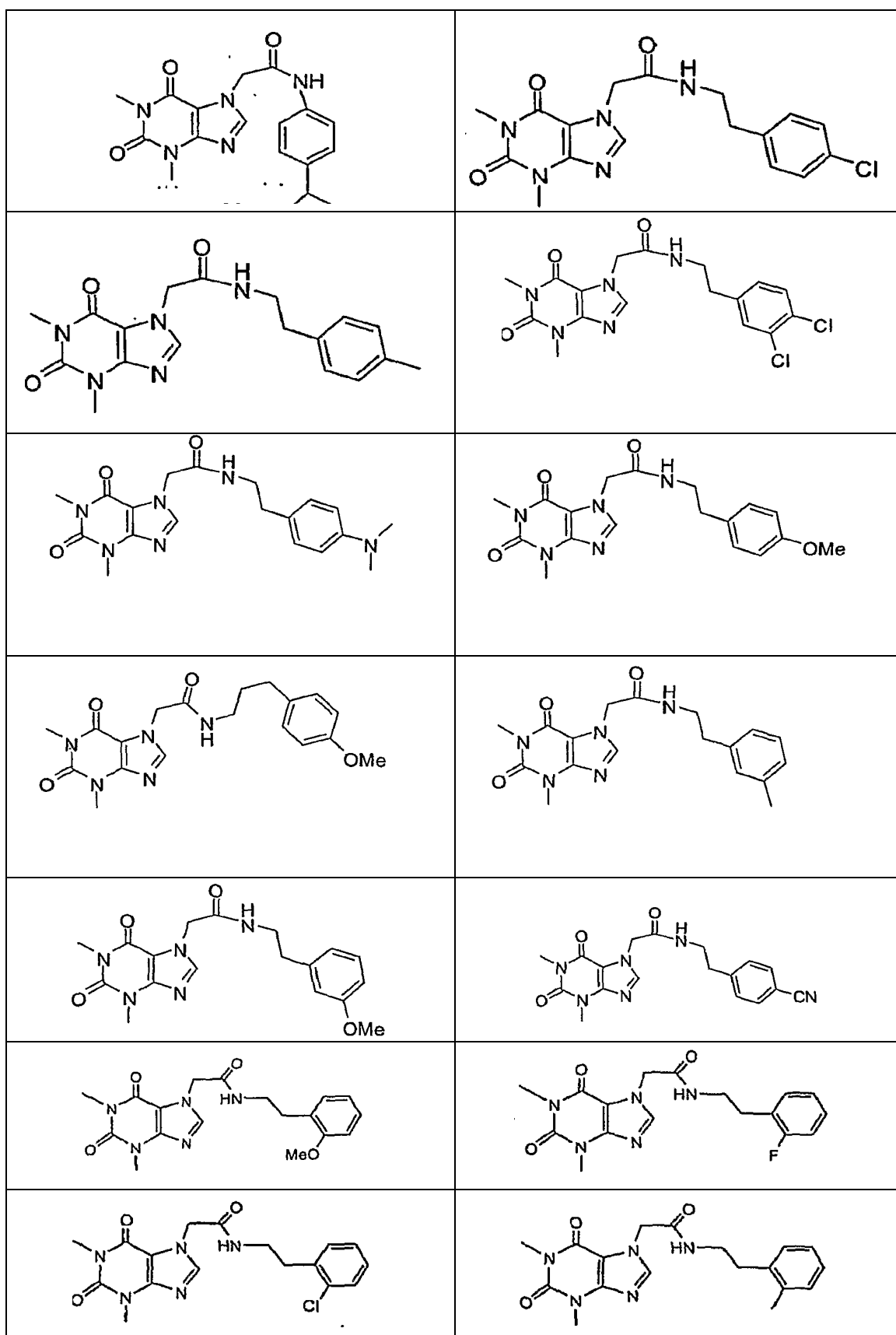
**Tabla I**

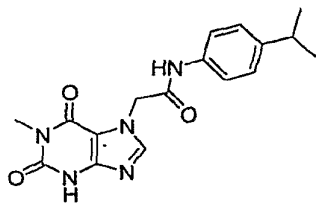
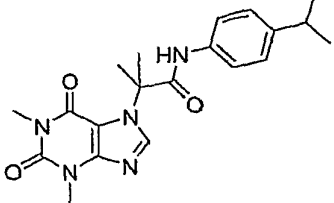
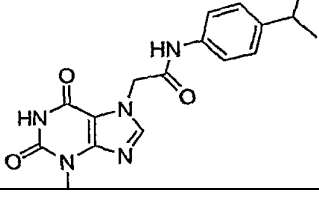
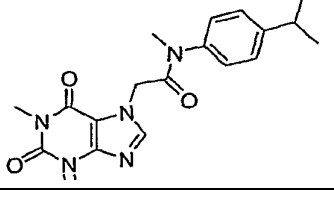
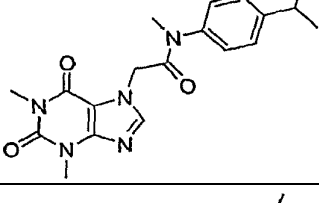
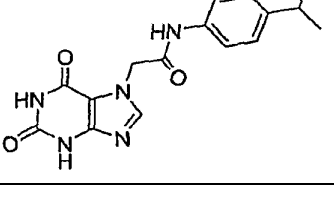
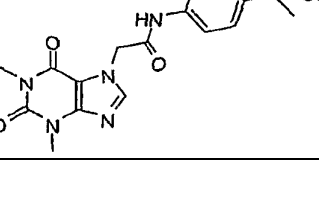
**Inhibidores del receptor TRPA1**





Otros ejemplos de inhibidores del receptor de TRPA1 son:

Oxima de (1E, 3E)-1-(4-fluorofenil)-2-metilpent-1-en-3-ona

O-metiloxima de (1E, 3E)-1-(4-fluorofenil)-2-metilpent-1-en-3-ona

5 Oxima de (1E, 3E)-1-(2-fluorofenil)-2-metilpent-1-en-3-ona

Oxima de (1E, 3E)-1-(4-fluorofenil)-2-metilhex-1-en-3-ona

Oxima de (1E, 3E)-1-(4-fluorofenil)-2,4,4-trimetilpent-1-en-3-ona

Oxima de (1E, 3E)-1-(4-fluorofenil)-2-metilhept-1-en-3-ona

Oxima de (1E, 3Z)-1-(4-fluorofenil)-2,4-dimetilpent-1-en-3-ona

10 Oxima de (1E, 3E)-1-(4-fluorofenil)-2,4-dimetilpent-1-en-3-ona

Oxima de (1E, 3E)-1-(3-cloro-4-fluorofenil)-2-metilpent-1-en-3-ona

Oxima de (1E, 3Z)-1-(4-fluorofenil)-2-metilpent-1-en-3-ona

Oxima de (1E, 3E)-4-(4-fluorofenil) but-3-en-2-ona

Oxima de (1E, 3E)-1-(4-fluorofenil) hex-1-en-3-ona



Oxima de (1E, 3E)-1-(4-fluorofenil) pent-1-en-3-ona

Oxima de (1E, 3Z)-1-(4-fluorofenil) pent-1-en-3-ona

Oxima de (1E, 3E)-1-(3,4-difluorofenil)-2-metilpent-1-en-3-ona

Oxima de (1E, 3E)-2-metil-1-(3,4,5-trifluorofenil)pent-1-en-3-ona

- 5 En una forma de realización particular, el inhibidor de TRPA1 se selecciona del grupo que consiste en 2-(1,3-dimetil-2,6-dioxo-1,2,3,6-tetrahidro-7H-purin-7-il)-N-(4-isopropilfenil) acetamida (HC-030031), oxima de 4-(4-clorofenil)-3-metil-3-buten-2-ona (AP18), alcanfor, mentol, gadolinio, rojo de rutenio, gentamicina, amilorida y combinaciones de los mismos.
- 10 De forma aún más preferente, el inhibidor de TRPA1 es 2-(1,3-dimetil-2,6-dioxo-1,2,3,6-tetrahidro-7H-purin-7-il)-N-(4-isopropilfenil)acetamida (HC-030031).

- En una realización particular de la presente invención, el inhibidor de TRPA1 se selecciona del grupo formado por un anticuerpo inhibidor que puede unirse específicamente e inhibir la actividad del receptor TRPA1, una ribozima o una enzima
- 15 de ADN específica para la secuencia del receptor TRPA1, un ARN de interferencia específico para la secuencia del receptor TRPA1, un péptido inhibidor específico para el receptor TRPA1 y un ácido nucleico antisentido específico para el receptor TRPA1.

#### Anticuerpos inhibidores del receptor TRPA1

- Los anticuerpos contra un epítipo ubicado en o bien el poro o bien una parte externa de la molécula de TRPA1 pueden inhibir de manera eficaz la función de esta proteína y, por tanto, pueden usarse como bloqueante o inhibidor en las composiciones de la presente invención. Por tanto, “anticuerpo inhibidor”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a anticuerpos que pueden inhibir al menos parcialmente las actividades biológicas del receptor TRPA1.
- 20
  - 25 La determinación de la capacidad inhibidora sobre la capacidad biológica del receptor TRPA1 se detecta usando ensayos convencionales para medir el catión liberado a través del receptor TRPA1 usando métodos descritos anteriormente.

- Anticuerpos inhibidores o fragmentos específicos para el receptor TRPA1 pueden estar disponibles fácilmente, o pueden producirse fácilmente usando técnicas de biología molecular convencionales. Por ejemplo, usando inmunógenos derivados de, por
- 30

ejemplo, una molécula de receptor TRPA1 es posible obtener anticuerpos monoclonales o antiseros anti-proteína/anti-péptido usando protocolos convencionales (véase, por ejemplo, Antibodies: A Laboratory Manual ed. por Harlow y Lane (Cold Spring Harbor Press: 1988)). Un mamífero, tal como un ratón, un hámster o un conejo puede

5 inmunizarse con una forma inmunogénica del péptido (por ejemplo, el receptor TRPA1 o un fragmento antigénico del mismo, que puede provocar una respuesta de anticuerpos). Las técnicas para conferir inmunogenicidad en una proteína o un péptido, incluyendo la conjugación con portadores u otras técnicas, se conocen bien en la técnica. Puede administrarse una parte inmunogénica de un polipéptido en presencia de

10 un adyuvante. Puede monitorizarse el avance de la inmunización mediante la detección de títulos de anticuerpo en plasma o suero. Pueden usarse ELISA convencional u otros inmunoensayos con el inmunógeno como antígeno para evaluar los niveles de anticuerpos. En una realización preferida, los anticuerpos que forman parte de las composiciones de la invención son inmunoespecíficos para determinantes antigénicos

15 del receptor TRPA1 (o una variante al menos un 80%, 85%, 90%, 95% o 98% idéntica al mismo). En cierta realización, los anticuerpos sujeto inmunoespecíficos no reaccionan de manera cruzada sustancialmente con una proteína relacionada con el receptor TRPA1 no de vertebrado (tal como levadura). Por “no reacciona de manera cruzada sustancialmente”, quiere decirse que el anticuerpo tiene una afinidad de unión

20 para una proteína no homóloga que es al menos un orden de magnitud, más preferiblemente al menos 2 órdenes de magnitud, e incluso más preferiblemente al menos 3 órdenes de magnitud menor que la afinidad de unión del anticuerpo para el receptor TRPA1.

Por tanto, el anticuerpo que puede usarse para los fines de la presente invención como

25 anticuerpo inhibidor del receptor TRPA1, denominado a continuación en el presente documento el “anticuerpo de la invención”, puede unirse a un epítipo del receptor TRPA1; normalmente, se requieren al menos 6, 8, 10 ó 12 aminoácidos contiguos para formar un epítipo, sin embargo, los epítipos que implican aminoácidos no contiguos pueden requerir más, por ejemplo, al menos 15, 25 ó 50 aminoácidos. La expresión

30 “anticuerpo de la invención” incluye, por ejemplo, anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, fragmentos Fab y Fv de cadena sencilla (scFv) de los mismos, anticuerpos biespecíficos, heteroconjugados, anticuerpos humanos y humanizados.

Tales anticuerpos pueden producirse en una variedad de modos, incluyendo cultivos de hibridoma, expresión recombinante en cultivos de células de mamífero o bacterias y expresión recombinante en animales transgénicos. También pueden producirse anticuerpos seleccionando una secuencia de una biblioteca de secuencias expresadas en sistemas de presentación tales como fagos filamentosos, bacterias, levaduras o ribosomas. Existe una orientación abundante en la bibliografía para seleccionar una metodología de producción particular, por ejemplo, Chadd y Chamow, Curr. Opin. Biotechnol., 12:188-194 (2001). La elección de la metodología de fabricación depende de varios factores que incluyen la estructura de anticuerpo deseada, la importancia de restos de hidratos de carbono en los anticuerpos, la facilidad de cultivo y purificación, y los costes. Pueden generarse muchas estructuras de anticuerpos diferentes usando tecnología de expresión convencional, incluyendo anticuerpos de longitud completa, fragmentos de anticuerpo, tales como fragmentos Fab y Fv, así como anticuerpos quiméricos que comprenden componentes de especies diferentes. Fragmentos de anticuerpo de tamaño pequeño, tales como fragmentos Fab y Fv, que no tienen funciones efectoras y que tienen actividad farmacocinética limitada pueden generarse en un sistema de expresión bacteriano. Fragmentos Fv de cadena sencilla muestran baja inmunogenicidad y se eliminan rápidamente de la sangre.

Los anticuerpos de la invención pueden ser anticuerpos policlonales. Tales anticuerpos policlonales pueden producirse en un mamífero, tal como un mamífero no humano, por ejemplo, tras una o más inyecciones de un agente inmunizante y, preferiblemente, un adyuvante. Normalmente, el agente inmunizante y/o adyuvante se inyectará en el mamífero mediante una serie de inyecciones subcutáneas o intraperitoneales. El agente inmunizante puede incluir receptores TRPA1 o fragmentos de los mismos o una proteína de fusión de los mismos o una célula que expresa receptores TRPA1. Tales proteínas, fragmentos o preparaciones se introducen en el mamífero no humano en presencia de un adyuvante apropiado. Otra forma de administración de un inmunógeno es como una proteína transmembrana en la superficie de una célula (métodos descritos en, por ejemplo, Spiller *et al.* J. Immunol. Methods, 224: 51-60 (1999)). Estas células pueden ser o bien células que expresan de manera natural el antígeno o bien en las que esta expresión puede obtenerse tras transfectar la célula con un constructo de ADN que contiene entre otras secuencias de ADN las que codifican para el antígeno, las

necesarias para su expresión suficiente en la célula. Este enfoque es posible no sólo cuando la membrana celular es el sitio natural en el que se expresa el antígeno sino que incluso una vez sintetizado el antígeno en la célula se dirige a esta ubicación mediante un péptido señal que se añade a la secuencia que codifica para el antígeno. Si el suero  
5 contiene anticuerpos policlonales frente a epítomos no deseados, los anticuerpos policlonales pueden purificarse mediante cromatografía de inmunoafinidad.

Alternativamente, dichos anticuerpos pueden ser anticuerpos monoclonales. Pueden producirse anticuerpos monoclonales mediante hibridomas, en los que se inmuniza un ratón, un hámster u otro animal huésped apropiado con un agente inmunizante para  
10 provocar linfocitos que producen o pueden producir anticuerpos que se unirán específicamente al agente inmunizante, por ejemplo Kohler y Milstein, Nature 256:495 (1975). El agente inmunizante incluirá normalmente el receptor TRPA1 o un fragmento del mismo o una proteína de fusión del mismo y opcionalmente un portador o una preparación en bruto de proteínas que se ha enriquecido con el receptor TRPA1 o una  
15 célula que expresa cualquiera de dichas proteínas. Tales proteínas, fragmentos o preparaciones se introducen en el mamífero no humano en presencia de un adyuvante apropiado. Otra forma de administración de un inmunógeno es como una proteína transmembrana en la superficie de una célula (métodos descritos en, por ejemplo, Spiller *et al.* J. Immunol. Methods, 224: 51-60 (1999)). Estas células pueden ser  
20 cualquiera que exprese de manera natural el antígeno en su membrana celular o en la que esta expresión pueda obtenerse tras transfectar la célula con un constructo de ADN que contiene entre otras secuencias de ADN las que codifican para el antígeno, las necesarias para su expresión suficiente en la célula. Este enfoque es posible no sólo cuando la membrana celular es el sitio natural en el que se expresa el antígeno sino que  
25 incluso una vez sintetizado el antígeno en la célula se dirige a esta ubicación mediante un péptido señal que se añade a la secuencia que codifica para el antígeno. Alternativamente, pueden inmunizarse linfocitos *in vitro*. Generalmente, se usan células del bazo o células de ganglios linfáticos si se desean fuentes de mamífero no humanos, o se usan linfocitos de sangre periférica (“PBL”) si se desean células de origen humano.  
30 Los linfocitos se fusionan con una línea de células inmortalizada usando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para producir una célula de hibridoma. En general, las líneas de células inmortalizadas son células de mieloma de origen de rata,

- ratón, bovino o humano. Las células de hibridoma se cultivan en un medio de cultivo adecuado que contiene preferiblemente una o más sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de células no fusionadas, inmortalizadas. Se aíslan clones usando el método de dilución limitativa y el medio de cultivo (sobrenadante) en el que las células
- 5 de hibridoma se cultivan puede someterse a ensayo para detectar la presencia de anticuerpos monoclonales dirigidos contra receptores TRPA1 mediante técnicas convencionales, tales como mediante citometría de flujo o mediante inmunoprecipitación o mediante otro ensayo de unión *in vitro*, tal como RIA o ELISA. También pueden cultivarse clones *in vivo* como tumores ascíticos en un animal.
- 10 Preferiblemente, la especificidad de unión de anticuerpos monoclonales producidos mediante un clon de células de hibridoma se determina mediante inmunoprecipitación o mediante un ensayo de unión *in vitro*, tal como radioinmunoanálisis (RIA) o ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) o mediante técnicas inmunofluorescentes tales como microscopía de fluorescencia o citometría de flujo. Los anticuerpos
- 15 monoclonales secretados por los subclones se separan de manera adecuada del medio de cultivo, fluido ascítico o suero mediante procedimientos de purificación de inmunoglobulinas convencionales tales como, por ejemplo, proteína A-Sepharose, cromatografía en hidroxapatita, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad.
- 20 Los anticuerpos monoclonales también pueden prepararse mediante métodos de ADN recombinante, tales como los descritos en el documento US 4.816.567. Puede aislarse ADN que codifica para los anticuerpos monoclonales de la invención a partir de células de hibridoma específicas del receptor TRPA1 y puede secuenciarse usando procedimientos convencionales, por ejemplo, usando sondas oligonucleotídicas que
- 25 pueden unirse específicamente a genes que codifican para las cadenas pesada y ligera de anticuerpos murinos. Las células de hibridoma sirven como fuente preferida de tal ADN. Una vez aislado, el ADN puede insertarse en un vector de expresión, que se transfecta entonces en células huésped tales como células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO) o células de mieloma que no producen de otro modo
- 30 proteína inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células huésped recombinantes. El ADN también puede modificarse, por ejemplo, sustituyendo la secuencia que codifica para los dominios constantes de cadena pesada y

ligera murinos por las secuencias humanas homólogas, o uniendo covalentemente a la  
 secuencia que codifica para las inmunoglobulinas toda o parte de la secuencia que  
 codifica para un polipéptido distinto de inmunoglobulina. El polipéptido distinto de  
 inmunoglobulina puede sustituirse por los dominios constantes de un anticuerpo de la  
 5 invención, o puede sustituirse por los dominios variables de un sitio de combinación de  
 antígenos de un anticuerpo de la invención para crear un anticuerpo bivalente  
 quimérico.

Otro método de generación de anticuerpos específicos, o fragmentos de anticuerpos,  
 reactivos frente a una molécula diana es examinar bibliotecas de expresión que  
 10 codifican para genes de inmunoglobulinas, o partes de los mismos, expresados en  
 bacterias, levaduras, fagos filamentosos, ribosomas o subunidades ribosomales y otros  
 sistemas de presentación. Estos métodos normalmente usan bibliotecas grandes de  
 secuencias de anticuerpo o secuencias de fragmentos de anticuerpo obtenidas a partir de  
 diversas fuentes tales como donantes sanos o pacientes o animales sanos o no. Estas  
 15 secuencias se clonan y expresan en un sistema apropiado y se seleccionan por su  
 afinidad de unión para el antígeno. Se han descrito diversos enfoques para seleccionar  
 anticuerpos o fragmentos con propiedades deseadas por ejemplo neutralizantes,  
 agonistas, etc. (Fernández, Curr. Op. Biotech., 15: 364-373 (2004); Schmidt, Eur. J.  
 Biochem., 268: 1730-1738 (2001)). En una realización, también pueden producirse  
 20 anticuerpos y fragmentos de anticuerpo característicos de hibridomas de la invención  
 por medios recombinantes extrayendo ARN mensajero, construyendo una biblioteca de  
 ADNc y seleccionando clones que codifican para segmentos de la molécula de  
 anticuerpo.

Los anticuerpos también pueden modificarse mediante ingeniería genética para alterar  
 25 sus usos clínicos. Numerosos enfoques hacen uso de la biología molecular y de técnicas  
 genéticas tal como el buen conocimiento de la genética y la estructura de las  
 inmunoglobulinas para construir diferentes modificaciones de la molécula de  
 inmunoglobulina con el objetivo de mejorar sus propiedades para usos clínicos u otros  
 usos. Algunos de ellos tienden a reducir la inmunogenicidad de la molécula en la  
 30 especie en la que debe usarse y la molécula resultante tiene una secuencia más  
 homóloga con esta especie. Diversos métodos se han usado para obtener Acm de origen  
 humano evitando los procedimientos no admisibles éticamente en seres humanos sanos.

En otros enfoques se reducen el peso y el tamaño moleculares por ejemplo con el fin de mejorar la distribución de la molécula al interior de tumores sólidos. Otras posibilidades son la conjugación en una molécula de dominios de unión para más de una molécula diana (anticuerpo biespecífico o también triespecífico, etc.) o la conjugación de un anticuerpo o un fragmento con otra molécula con la función deseada por ejemplo un agente tóxico, una hormona, un factor de crecimiento, un agente inmunomodulador (inmunosupresor o inmunoestimulante), un inhibidor del crecimiento celular, etc. En general todas las moléculas resultantes conservan casi un dominio variable de un antígeno-anticuerpo. Algunos ejemplos de estas construcciones son:

- Anticuerpos quiméricos: Éstos se refieren a anticuerpos contruidos con regiones variables de un anticuerpo de algunas especies (normalmente un mamífero en el que se generó el Acm) y regiones constantes de otra especie (aquella en la que va a usarse el anticuerpo quimérico);
- Anticuerpos humanizados: Por “anticuerpo humanizado” quiere decirse un anticuerpo derivado de un anticuerpo no humano, normalmente un anticuerpo murino, que conserva las propiedades de unión a antígeno del anticuerpo original, pero que es menos inmunogénico en seres humanos. Esto puede conseguirse mediante diversos métodos, incluyendo (a) injertar todos los dominios variables no humanos en regiones constantes humanas para generar anticuerpos quiméricos; (b) injertar sólo las regiones determinantes de complementariedad (CDR) no humanas en regiones constantes y de entramado humanas con o sin retención de residuos de entramado críticos; y (c) trasplantar todos los dominios variables no humanos, pero “rodearlos” con una sección de tipo humano mediante la sustitución de residuos de superficie. En la técnica se han descrito métodos para humanizar anticuerpos no humanos. Preferiblemente, un anticuerpo humanizado tiene uno o más residuos de aminoácido introducidos en él de una fuente que es no humana. Estos residuos de aminoácido no humanos se denominan a menudo residuos “de importación”, que se toman normalmente de un dominio variable “de importación”. La humanización puede realizarse esencialmente siguiendo el método de Winter y colaboradores (Jones *et al.*, Nature, 321:522-525 (1986); Reichmann *et al.*, Nature, 332:323-327 (1988);

- Verhoeven *et al.*, Science, 239:1534-1536 (1988)), sustituyendo secuencias de regiones hipervariables por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. (Carter *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285 (1992); Presta *et al.*, J. Immunol., 151:2623 (1993)). Además es importante que los anticuerpos se humanicen conservando su alta afinidad para el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para conseguir este objetivo, según un método preferido, se preparan anticuerpos humanizados mediante un proceso de análisis de las secuencias originales y diversos productos humanizados conceptuales usando los modelos tridimensionales de las secuencias originales y humanizadas.
- 5
- 10 - Anticuerpos primatizados: Una etapa siguiente en este enfoque de preparación de un anticuerpo más similar al de seres humanos son los denominados anticuerpos primatizados, es decir un anticuerpo recombinante que se ha modificado mediante ingeniería genética para contener los dominios pesado y ligero variables de un anticuerpo de mono (u otro primate), en particular, un anticuerpo de mono *cynomolgus*, y que contiene secuencias de dominios constantes humanos, preferiblemente el dominio constante de inmunoglobulina gamma 1 o gamma 4 humana (o variante PE). La preparación de tales anticuerpos se describe en Newman *et al.*, Biotechnology, 10: 1458-1460 (1992); documentos US 5.658.570 y US 6.113.898. Se ha notificado que estos anticuerpos muestran un alto grado de homología con anticuerpos humanos, es decir, el 85-98%, presentan funciones efectoras humanas, tienen una inmunogenicidad reducida y pueden mostrar una alta afinidad con antígenos humanos. Otro medio altamente eficaz para generar anticuerpos recombinantes se da a conocer por Newman, Biotechnology, 10: 1455-1460 (1992).
- 15
- 20
- 25 - Anticuerpos humanos: Por “anticuerpo humano” quiere decirse un anticuerpo que contiene la cadena ligera y pesada humana en su totalidad así como regiones constantes, producido mediante cualquiera de los métodos convencionales conocidos. Como alternativa a la humanización, pueden generarse anticuerpos humanos. Por ejemplo, ahora es posible producir animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que pueden, tras la inmunización, producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulina endógena. Por ejemplo, se ha descrito que la delección
- 30



- homocigótica del gen PH) de la región de unión a la cadena pesada del anticuerpo en ratones mutantes de línea germinal y quiméricos da como resultado la inhibición completa de la producción de anticuerpo endógeno. La transferencia de la serie de genes de inmunoglobulina de línea germinal humana en tales ratones mutantes de línea germinal dará como resultado la producción de anticuerpos humanos tras la inmunización. Véase, por ejemplo, Jakobovits *et al.*, Proc. Mad. Acad. Sci. USA, 90:255 1 (1993); Jakobovits *et al.*, Nature, 362:255-258 (1993). Alternativamente, puede usarse la tecnología de presentación en fago (McCafferty *et al.*, Nature 348:552-553 (1990)) para producir anticuerpos humanos y fragmentos de anticuerpo *in vitro*, a partir de repertorios de genes de dominios variables (V) de inmunoglobulina de donantes. Según esta técnica, los genes de dominios V de anticuerpos se clonan en marco en un gen de la proteína de envuelta o bien principal o bien minoritaria de un bacteriófago filamentoso, tal como M13 o fd, y se presentan como fragmentos de anticuerpo funcionales sobre la superficie de la partícula de fago. Dado que la partícula filamentosa contiene una copia de ADN monocatenario del genoma de fago, las selecciones basadas en las propiedades funcionales del anticuerpo también dan como resultado la selección del gen que codifica para el anticuerpo que muestra esas propiedades. Por tanto, el fago imita algunas de las propiedades de la célula B. La presentación en fago puede realizarse en una variedad de formatos; para su revisión véase, por ejemplo, Johnson, Kevin S. y Chiswell, David J., Current Opinion in Structural Biology 3:564-57 1 (1993). También pueden generarse anticuerpos humanos mediante células B activadas *in vitro* o ratones SCID con su sistema inmunitario reconstituido con células humanas. Una vez obtenido un anticuerpo humano, sus secuencias de ADN codificante pueden aislarse, clonarse e introducirse en un sistema de expresión apropiado, es decir, una línea celular preferiblemente de un mamífero que se expresa posteriormente y se libera al medio de cultivo a partir del cual puede aislarse el anticuerpo.
- Fragmentos de anticuerpo: Un fragmento de anticuerpo es un fragmento de un anticuerpo tal como, por ejemplo, Fab, F(ab')<sub>2</sub>, Fab' y scFv. Se han desarrollado diversas técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo. Tradicionalmente, estos fragmentos se derivaron por medio de digestión

proteolítica de anticuerpos intactos pero más recientemente estos fragmentos pueden producirse directamente mediante células huésped recombinantes. En otras realizaciones, el anticuerpo de elección es un fragmento de Fv de cadena sencilla (scFv) que adicionalmente puede ser monoespecífico o biespecífico. La

5 digestión con papaína de anticuerpos produce dos fragmentos de unión a antígeno idénticos, denominados fragmentos “Fab”, cada uno con un único sitio de unión a antígeno, y un fragmento “Fc” residual, cuyo nombre refleja su capacidad para cristalizar fácilmente. El tratamiento con pepsina produce un fragmento  $F(ab')_2$  que tiene dos sitios de unión a antígeno y que todavía puede

10 reticular el antígeno. “Fv” es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio de reconocimiento de antígeno y de unión a antígeno completo. Esta región consiste en un dímero de un dominio variable de cadena ligera y uno de cadena pesada en asociación estrecha, no covalente. Es en esta configuración en la que las tres regiones hipervariables de cada dominio variable interaccionan para

15 definir un sitio de unión a antígeno en la superficie del dímero VH-VL. Colectivamente, las seis regiones hipervariables confieren especificidad de unión a antígeno al anticuerpo. Sin embargo, incluso un único dominio variable (o la mitad de un Fv que comprende sólo tres regiones hipervariables específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse al antígeno, aunque a una

20 afinidad inferior a la de todo el sitio de unión. El fragmento Fab también contiene el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CHI) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab por la adición de algunos residuos en el extremo carboxilo terminal del dominio CHI de cadena pesada que incluyen una o más cisteínas de la región bisagra del

25 anticuerpo. Fab'-SH es la designación en el presente documento para Fab' en el que el/los residuo(s) de cisteína de los dominios constantes llevan al menos un grupo tiol libre. Se produjeron originariamente fragmentos de anticuerpo  $F(ab')_2$  como pares de fragmentos Fab' que tienen cisteínas bisagra entre ellos. Se conocen también otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpo.

30 Los fragmentos de anticuerpo “Fv de cadena sencilla” o “scFv” comprenden los dominios VH y VL de un anticuerpo, en el que estos dominios están presentes en una única cadena polipeptídica. Preferiblemente, el polipéptido Fv comprende además un ligador polipeptídico entre los dominios VH y VL que permite que el

- scFv forme la estructura deseada para la unión al antígeno. Para una revisión de scFv, véase Pluckthun en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg y Moore eds., Springer-Verlag, N.Y., págs. 269-315 (1994). El término “diacuerpos” se refiere a pequeños fragmentos de anticuerpo con dos sitios de unión a antígeno, fragmentos que comprenden un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de cadena ligera (VL) en la misma cadena polipeptídica (VH-VL). Usando un ligador que es demasiado corto para permitir el apareamiento entre los dos dominios en la misma cadena, se fuerza que los dominios se apareen con los dominios complementarios de otra cadena y creen dos sitios de unión a antígeno. Se describen diacuerpos más completamente en, por ejemplo, los documentos EP 404.097; WO 93/11161; y Hollinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993).
- Anticuerpos biespecíficos: Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos que tienen especificidades de unión por al menos dos epítopos diferentes. Se conocen en la técnica métodos para preparar anticuerpos biespecíficos. La producción tradicional de anticuerpos biespecíficos de longitud completa se basa en la coexpresión de dos pares de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina, en la que las dos cadenas tienen especificidades diferentes (Millstein *et al.*, *Nature*, 305:537-539 (1983)). Debido a la distribución al azar de cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina, estos hibridomas (cuadromas) producen una mezcla potencial de 10 moléculas de anticuerpo diferentes, de las que sólo una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta, que se realiza mediante etapas de cromatografía de afinidad, es bastante engorrosa, y los rendimientos de producto son bajos. Se dan a conocer procedimientos similares en el documento WO 93/08829, y en Traunecker *et al.*, *EMBO J*, 10:3655-3659 (1991).

#### Ribozimas específicas del receptor TRPA1

- También pueden usarse moléculas de ribozima diseñadas para escindir catalíticamente transcritos de un ARNm diana para impedir la traducción de ARNm del receptor TRPA1. En consecuencia, en otra realización, las composiciones de la invención comprenden ribozimas específicamente dirigidas al ARNm del receptor TRPA1. Las

ribozimas son moléculas de ARN enzimáticas que pueden catalizar la escisión específica del ARN (para una revisión, véase Rossi, *Current Biology* 4:469-471, 1994). El mecanismo de acción de las ribozimas implica una hibridación específica de secuencia de la molécula de ribozima con el ARN diana complementario, seguida por un acontecimiento de escisión endonucleolítica. La composición de moléculas de ribozima incluye preferiblemente una o más secuencias complementarias a un ARNm diana, y la secuencia catalítica bien conocida responsable de la escisión del ARNm o una secuencia funcionalmente equivalente (véase, por ejemplo, la patente estadounidense número 5.093.246, incorporada al presente documento como referencia en su totalidad).

Aunque pueden usarse ribozimas que escinden el ARNm en secuencias de reconocimiento específicas de sitio para destruir ARNm dianas, se prefiere el uso de ribozimas de cabeza de martillo. Las ribozimas de cabeza de martillo escinden ARNm en ubicaciones dictadas por regiones flanqueantes que forman pares de bases complementarias con el ARNm diana. Preferiblemente, el ARNm diana tiene la siguiente secuencia de dos bases: 5'-UG-3'. La construcción y producción de ribozimas de cabeza de martillo se conoce bien en la técnica y se describe más completamente en Haseloff y Gerlach, *Nature* 334: 585-591, 1988; y véase la solicitud PCT número WO89/05852, cuyo contenido se incorpora al presente documento como referencia. Las secuencias de ribozimas de cabeza de martillo pueden incrustarse en un ARN estable tal como un ARN de transferencia (ARNt) para aumentar la eficacia de escisión *in vivo* (Perriman *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92: 6175-79, 1995; de Feyter, y Gaudron, *Methods in Molecular Biology*, vol. 74, capítulo 43, "Expressing Ribozymes in Plants", editado por Turner, P. C, Humana Press Inc., Totowa, N.J.). En particular, se conoce bien en la técnica la expresión de ribozimas de fusión con ARNt mediada por ARN polimerasa III (véanse, Kawasaki *et al.*, *Nature* 393: 284-9, 1998; Kuwabara *et al.*, *Nature Biotechnol.* 16: 961-5, 1998; y Kuwabara *et al.*, *Mol. Cell.* 2: 617-27, 1998; Koseki *et al.*, *J Virol* 73: 1868-77, 1999; Kuwabara *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 1886-91, 1999; Tanabe *et al.*, *Nature* 406: 473-4, 2000). Normalmente, hay varios posibles sitios de escisión de ribozimas de cabeza de martillo dentro de una secuencia de ADNc diana dada. Preferiblemente, la ribozima se diseña mediante ingeniería genética de modo que el sitio de reconocimiento de la escisión se ubica cerca del

extremo 5' del ARNm diana para aumentar la eficacia y minimizar la acumulación intracelular de transcritos de ARNm no funcionales. Además, el uso de cualquier sitio de reconocimiento de la escisión ubicado en la secuencia diana que codifica para diferentes partes de los dominios de aminoácidos C-terminales de, por ejemplo, formas  
 5 largas y cortas de la diana permitiría la selección como diana selectiva de una u otra forma de la diana y, por tanto, tendría un efecto selectivo sobre una forma del producto génico diana.

Las ribozimas que seleccionan como diana genes contienen necesariamente una región de hibridación complementaria a dos regiones, cada una de al menos 5 y  
 10 preferiblemente cada una de 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ó 20 nucleótidos contiguos de longitud de un ARNm diana, tal como un ARNm de una secuencia representada en los genes del receptor TRPA1. Además, las ribozimas tienen actividad endorribonucleasa altamente específica, que escinde de manera autocatalítica el ARNm sentido diana. La presente invención se extiende a ribozimas que se hibridan  
 15 con un ARNm sentido codificado por un gen diana tal como un gen candidato a diana farmacológica terapéutica, hibridándose de ese modo con el ARNm sentido y escindiéndolo, de manera que ya no puede traducirse más para sintetizar un producto polipeptídico funcional.

Las ribozimas usadas en las composiciones de la presente invención incluyen también  
 20 endorribonucleasas de ARN (a continuación en el presente documento "ribozimas de tipo Cech") tales como las que se producen de manera natural en *Tetrahymena thermophila* (conocidas como IVS, o ARN IVS L-19) y que se han descrito de manera extensa por Thomas Cech y colaboradores (Zaug *et al.*, Science 224:574-578, 1984; Zaug *et al.*, Science 231: 470-475, 1986; Zaug *et al.*, Nature 324: 429-433, 1986;  
 25 solicitud de patente internacional publicada número WO88/04300 por University Patents Inc.; Been, *et al.*, Cell 47: 207-216, 1986). Las ribozimas de tipo Cech tienen un sitio activo de ocho pares de bases que se hibrida con una secuencia de ARN diana tras lo que tiene lugar la escisión del ARN diana. La invención abarca aquellas ribozimas de tipo Cech que seleccionan como diana secuencias de sitio activo de ocho pares de bases  
 30 que están presentes en una secuencia de ácido nucleico o un gen diana.

Las ribozimas pueden estar compuestas por oligonucleótidos modificados (por ejemplo, para obtener estabilidad, direccionamiento, etc. mejorados) y deben suministrarse a

células que expresan el gen diana *in vivo*. Un método preferido de suministro implica usar un constructo de ADN que “codifica” para la ribozima bajo el control de un promotor pol III o pol II constitutivo fuerte, de modo que las células transfectadas producirán suficientes cantidades de la ribozima para destruir mensajes diana endógenos e inhibir la traducción. Debido a que las ribozimas, a diferencia de las moléculas antisentido, son catalíticas, se requiere una concentración intracelular inferior para lograr eficacia.

En ciertas realizaciones, puede diseñarse una ribozima identificando en primer lugar una parte de la secuencia suficiente para provocar una desactivación eficaz mediante ARNi. Entonces puede incorporarse la misma parte de la secuencia en una ribozima. En este aspecto de la invención, las partes que seleccionan como diana genes de la ribozima o ARNi son sustancialmente la misma secuencia de al menos 5 y preferiblemente 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ó 20 o más nucleótidos contiguos de un ácido nucleico diana, tal como un ácido nucleico de cualquiera de las secuencias de ceramidasa ácida o colina cinasa humanas. En una cadena de ARN diana larga, números significativos de sitios diana no son accesibles a la ribozima debido a que están escondidos dentro de las estructuras secundaria o terciaria (Birikh *et al.*, Eur J Biochem 245: 1-16, 1997). Para superar el problema de la accesibilidad al ARN diana, se usan normalmente predicciones generadas por ordenador de la estructura secundaria para identificar dianas que lo más probablemente deben ser monocatenarias o tener una configuración “abierta” (véase Jaeger *et al.*, Methods Enzymol 183: 281-306, 1989). Otros enfoques utilizan un enfoque sistemático para predecir la estructura secundaria que implica evaluar un gran número de moléculas de oligonucleótidos de hibridación candidatas (véase Milner *et al.*, Nat Biotechnol 15: 537-41, 1997; y Patzel y Sczakiel, Nat Biotechnol 16: 64-8, 1998). Adicionalmente, la patente estadounidense número 6.251.588, cuyo contenido se incorpora al presente documento como referencia, describe métodos para evaluar secuencias de sondas oligonucleotídicas de modo que se predice el potencial de hibridación con una secuencia de ácido nucleico diana. El método de la invención proporciona el uso de tales métodos para seleccionar segmentos preferidos de una secuencia de ARNm diana que se predice que es monocatenaria y, además, para la utilización oportunista de una secuencia de ARNm diana igual o sustancialmente idéntica, que comprende de manera preferible aproximadamente 10-20

nucleótidos consecutivos del ARNm diana, en el diseño tanto de las ribozimas como de los oligonucleótidos de ARNi de la invención.

ARN de interferencia (ARNi) específico del receptor TRPA1

- 5 En otra realización, los inhibidores del receptor TRPA1 que forman parte de las composiciones de la invención son ARNi que pueden desactivar la expresión del receptor TRPA1 o cualquier gen componente necesario para una función del receptor TRPA1. La ARNi es un proceso de represión génica postranscripcional específica de
- 10 la degradación de un ARNm de una secuencia particular inducida por ARN bicatenario (ARNds) que es homólogo a esa secuencia. Por ejemplo, la expresión de un ARNds largo que corresponde a la secuencia de un ARNm monocatenario particular (ARNss) hará que ese mensaje sea lábil, “interfiriendo” de ese modo con la expresión del gen correspondiente. En consecuencia, puede reprimirse cualquier gen seleccionado
- 15 introduciendo un ARNds que corresponde a todo o una parte sustancial del ARNm para ese gen. Parece que cuando se expresa un ARNds largo, se procesa inicialmente mediante una ribonucleasa III para dar oligonucleótidos de ARNds más cortos de tan sólo 21 a 22 pares de bases de longitud. En consecuencia, la ARNi puede efectuarse mediante la introducción o expresión de ARNds homólogos relativamente cortos. De
- 20 hecho, el uso de ARNds homólogos relativamente cortos puede tener ciertas ventajas tal como se trata a continuación.

- Los oligonucleótidos bicatenarios usados para efectuar la ARNi tienen preferiblemente menos de 30 pares de bases de longitud y, más preferiblemente, comprenden aproximadamente 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18 ó 17 pares de bases de ácido
- 25 ribonucleico. Opcionalmente, los oligonucleótidos de ARNds de la invención pueden incluir extremos 3' en proyección. Proyecciones en 3' de 2 nucleótidos a modo de ejemplo pueden estar compuestas por residuos de ribonucleótido de cualquier tipo o incluso pueden estar compuestas por residuos de 2-desoxitimidina, lo que reduce el coste de la síntesis de ARN y puede potenciar la resistencia a nucleasa de ARNsi en el
- 30 medio de cultivo de células y dentro de las células transfectadas (véase Elbashir *et al.*, Nature 411: 494-8, 2001). También pueden utilizarse ARNds más largos de 50, 75, 100 o incluso 500 pares de bases o más en ciertas realizaciones de la invención.

- Concentraciones a modo de ejemplo de ARNds para efectuar la ARNi son de aproximadamente 0,05 nM, 0,1 nM, 0,5 nM, 1,0 nM, 1,5 nM, 25 nM o 100 nM, aunque pueden utilizarse otras concentraciones dependiendo de la naturaleza de las células tratadas, la diana génica y otros factores fácilmente apreciables por el experto. Pueden sintetizarse ARNds a modo de ejemplo químicamente o producirse *in vitro* o *in vivo* usando vectores de expresión apropiados. Los ARN sintéticos a modo de ejemplo incluyen ARN de 21 nucleótidos sintetizado químicamente usando métodos conocidos en la técnica (por ejemplo, timidina fosforamidita y fosforamiditas de ARN Expedite (Proligo, Alemania). Se desprotegen preferiblemente oligonucleótidos sintéticos y se purifican en gel usando métodos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Elbashir *et al.*, Genes Dev. 15: 188-200, 2001). Pueden transcribirse ARN más largos a partir de promotores, tales como promotores de ARN polimerasa de T7, conocidos en la técnica. Una única diana de ARN, colocada en ambas orientaciones posibles en el sentido de 3' respecto a un promotor *in vitro*, transcribirá ambas hebras de la diana para crear un oligonucleótido de ARNds de la secuencia diana deseada. Cualquiera de las especies de ARN anteriores se diseñará para que incluya una parte de la secuencia de ácido nucleico representada en un ácido nucleico diana, tal como, por ejemplo, un ácido nucleico que se hibrida, en condiciones rigurosas y/o fisiológicas, con el polinucleótido que codifica para el receptor TRPA1 humano.
- La secuencia específica utilizada en el diseño de los oligonucleótidos puede ser cualquier secuencia contigua de nucleótidos contenida dentro del mensaje génico expresado de la diana. Pueden usarse programas y algoritmos, conocidos en la técnica, para seleccionar secuencias diana apropiadas. Además, pueden seleccionarse secuencias óptimas utilizando programas diseñados para predecir la estructura secundaria de una secuencia de ácido nucleico monocatenario especificada y permitir la selección de aquellas secuencias que es probable que se produzcan en regiones monocatenarias expuestas de un ARNm plegado. Pueden encontrarse métodos y composiciones para diseñar oligonucleótidos apropiados, por ejemplo, en la patente estadounidense número 6.251.588, cuyo contenido se incorpora al presente documento como referencia.
- Generalmente, se piensa que el ARN mensajero (ARNm) es una molécula lineal que contiene la información para dirigir la síntesis de proteínas dentro de la secuencia de ribonucleótidos, sin embargo, estudios han revelado que existen varias estructuras



secundarias y terciarias en la mayoría de los ARNm. Los elementos de estructura secundaria en el ARN se forman en gran medida mediante interacciones de tipo Watson-Crick entre diferentes regiones de la misma molécula de ARN. Los elementos estructurales secundarios importantes incluyen regiones bicatenarias intramoleculares, bucles en horquilla, protuberancias en ARN dúplex y bucles internos. Se forman elementos estructurales terciarios cuando los elementos estructurales secundarios se ponen en contacto entre sí o con regiones monocatenarias para producir una estructura tridimensional más compleja. Varios investigadores han medido las energías de unión de un gran número de estructuras de ARN dúplex y han derivado un conjunto de reglas que pueden usarse para predecir la estructura secundaria del ARN (véase, por ejemplo, Jaeger *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 7706, 1989; y Turner *et al.*, Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem. 17:167, 1988). Las reglas son útiles en la identificación de elementos estructurales del ARN y, en particular, para identificar regiones de ARN monocatenario que pueden representar segmentos preferidos del ARNm para seleccionar como diana para lograr tecnologías antisentido, de ribozimas o de ARNi de silenciamiento. En consecuencia, pueden identificarse segmentos preferidos de la diana de ARNm para el diseño de oligonucleótidos de ARNs que median la ARNi así como para el diseño de composiciones de ribozimas y ribozimas de cabeza de martillo apropiadas de la invención.

Se han usado varios tipos diferentes de moléculas de manera eficaz en la tecnología de ARNi. El ARN de interferencia pequeño (ARNsi), conocido algunas veces como ARN de interferencia corto o ARN de silenciamiento, son una clase de moléculas de ARN bicatenario de 20-25 nucleótidos de longitud que desempeñan una variedad de papeles en biología. De la manera más notable, el ARNsi está implicado en la ruta de interferencia de ARN (ARNi) en la que el ARNsi interfiere con la expresión de un gen específico. Además de su papel en la ruta de ARNi, los ARNsi también actúan en rutas relacionadas con ARNi, por ejemplo, como un mecanismo antiviral o en la conformación de la estructura de la cromatina de un genoma. Se ha mostrado que ARNsi sintéticos pueden inducir la ARNi en células de mamífero. Este descubrimiento condujo a un aumento en el uso de ARNsi/ARNi para la investigación biomédica y el desarrollo de fármacos.

Los microARN (miARN) son una clase relacionada de pequeños ARN reguladores  
 génicos, normalmente de 21-23 nt de longitud. Difieren normalmente del ARNsi porque  
 se procesan a partir de precursores de ARN monocatenarios y muestran sólo una  
 complementariedad parcial con las dianas de ARNm. Estudios iniciales han indicado  
 5 que los miARN regulan la expresión génica de manera postranscripcional al nivel de la  
 inhibición de la traducción en los cuerpos P en el citoplasma. Sin embargo, los miARN  
 también pueden guiar la escisión del ARNm de manera similar a los ARNsi. Éste es a  
 menudo el caso en plantas en las que los sitios diana normalmente son altamente  
 complementarios al miARN. Aunque pueden encontrarse sitios diana en ARNm de  
 10 plantas en la UTR en 5', los marcos de lectura abiertos y la UTR en 3', en animales, es  
 la UTR en 3' la que es la diana principal. Los miARN se transcriben en primer lugar  
 como parte de un microARN primario (pri-miARN). Se procesa entonces mediante la  
 Drosha con la ayuda de Pasha/DGCR8 (=complejo de microprocesador) para dar  
 pre-miARN. Se exporta entonces el pre-miARN de aproximadamente 75 nt al  
 15 citoplasma mediante la exportina-5, en el que se corta entonces para dar moléculas  
 similares a ARNsi de 21-23 nt mediante Dicer. En algunos casos, pueden encontrarse  
 miARN múltiples en el pri-miARN.

El ARN horquillado corto (ARNsh) es aún otro tipo de ARN que puede usarse para  
 efectuar la ARNi. Es una secuencia de ARN que realiza un giro de horquilla estrecho  
 20 que puede usarse para silenciar la expresión génica. El ARNsh se transcribe mediante la  
 ARN polimerasa III.

En la actualidad, están usándose de manera extensa ARN de interferencia corto (ARNsi)  
 y ARN horquillado corto (ARNsh) para silenciar diversos genes para silenciar funciones  
 llevadas a cabo por los genes. Cada vez es más fácil aprovechar la ARNi para silenciar  
 25 genes específicos, debido al desarrollo de bibliotecas de constructos de silenciamiento  
 de genes de ARNsh y ARNsi de aplicación comercial usando una variedad de fuentes.  
 Por ejemplo, se ha desarrollado RNAi Codex, que consiste en una base de datos de  
 información relacionada con ARNsh y un sitio web asociado, como portal para recursos  
 de ARNsh públicamente disponibles y está accesible en <http://codex.cshl.org>. RNAi  
 30 Codex contiene actualmente datos de la biblioteca de ARNsh Hannon-Elledge y permite  
 el uso de nombres de genes fáciles para el biólogo para acceder a información sobre  
 constructos de ARNsh que pueden silenciar el gen de interés. Está diseñado para

contener publicaciones y anotaciones aportadas por el usuario para cada constructo, a medida que tales datos pasan a estar disponibles. Olson *et al.* (Nucleic Acids Res. 34 (Database issue): D153-D157, 2006, incorporado como referencia) han proporcionado descripciones detalladas sobre características de RNAi Codex, y han explicado el uso de la herramienta. Toda esta información puede usarse para ayudar al diseño de los diversos ARNsi o ARNsh que seleccionan como diana el receptor TRPA1 u otras proteínas de interés.

#### Ácidos nucleicos antisentido específicos del receptor TRPA1

En una realización adicional, la invención se refiere al uso de los ácidos nucleicos “antisentido” aislados para inhibir la expresión, por ejemplo, inhibiendo la transcripción y/o traducción de ácidos nucleicos de los receptores TRPA1. Los ácidos nucleicos antisentido pueden unirse a la posible diana farmacológica mediante complementariedad de pares de bases convencional o, por ejemplo, en el caso de la unión a dúplex de ADN, a través de interacciones específicas en el surco mayor de la doble hélice. En general, estos métodos se refieren a la gama de técnicas empleadas generalmente en la técnica, e incluyen cualquier método que se base en la unión específica a secuencias oligonucleotídicas.

Un constructo antisentido de la presente invención puede suministrarse, por ejemplo, como un plásmido de expresión que, cuando se transcribe en la célula, produce ARN que es complementario a al menos una parte única del ARNm celular que codifica para un polipéptido del receptor TRPA1. Alternativamente, el constructo antisentido es una sonda oligonucleotídica, que se genera *ex vivo* y que, cuando se introduce en la célula provoca la inhibición de la expresión mediante hibridación con las secuencias de ARNm y/o genómicas de un ácido nucleico diana. Tales sondas oligonucleotídicas son preferiblemente oligonucleótidos modificados, que son resistentes a nucleasas endógenas, por ejemplo, exonucleasas y/o endonucleasas, y por tanto son estables *in vivo*. Moléculas de ácido nucleico a modo de ejemplo para su uso como oligonucleótidos antisentido son análogos de fosforamidato, fosfotioato y metilfosfonato de ADN (véanse también las patentes estadounidenses números 5.176.996; 5.264.564; y 5.256.775). Adicionalmente, se han revisado enfoques generales para construir oligómeros útiles en la terapia antisentido, por ejemplo, por

Van der Krol *et al.*, BioTechniques 6: 958-976, 1988; y Stein *et al.*, Cancer Res 48: 2659-2668, 1988.

Con respecto al ADN antisentido, se prefieren oligodesoxirribonucleótidos derivados del sitio de iniciación de la traducción, por ejemplo, entre las regiones -10 y +10 del gen  
 5 diana. Los enfoques antisentido implican el diseño de oligonucleótidos (o bien ADN o bien ARN) que son complementarios al ARNm que codifica para el polipéptido diana. Los oligonucleótidos antisentido se unirán a los transcritos de ARNm y evitarán su traducción. No se requiere una complementariedad absoluta, aunque se prefiere. En el caso de ácidos nucleicos antisentido bicatenarios, puede someterse a prueba por tanto  
 10 una única hebra del ARN dúplex, o puede someterse a ensayo la formación de tríplex. La capacidad para hibridarse dependerá tanto del grado de complementariedad como de la longitud del ácido nucleico antisentido. Generalmente, cuando más largo sea el ácido nucleico de hibridación, más apareamientos erróneos de bases con un ARN podrá contener y formar todavía un dúplex estable (o tríplex, como puede ser el caso). Un  
 15 experto en la técnica puede establecer un grado tolerable de apareamientos erróneos mediante el uso de procedimientos convencionales para determinar el punto de fusión del complejo hibridado.

Oligonucleótidos que son complementarios al extremo 5' del ARNm, por ejemplo, la secuencia no traducida en 5' hasta e incluyendo el codón de iniciación AUG, deben  
 20 funcionar de la manera más eficaz en la inhibición de la traducción. Sin embargo, se ha mostrado recientemente que secuencias complementarias a las secuencias no traducidas en 3' de los ARNm son eficaces también en la inhibición de la traducción de los ARNm (Wagner, Nature 372: 333, 1994). Por tanto, oligonucleótidos complementarios a las regiones no codificantes, no traducidas o bien en 5' o bien en 3' de un gen podrían  
 25 usarse en un enfoque antisentido para inhibir la traducción de ese ARNm. Oligonucleótidos complementarios a la región no traducida en 5' del ARNm deben incluir el complemento del codón de iniciación AUG. Oligonucleótidos antisentido complementarios a las regiones codificantes del ARNm son inhibidores de la traducción menos eficaces, pero podrían usarse también según la invención. Ya se diseñen para  
 30 hibridarse con la región 5', 3' o codificante del ARNm, los ácidos nucleicos antisentido deben tener al menos seis nucleótidos de longitud, y preferiblemente tienen menos de

aproximadamente 100 y más preferiblemente menos de aproximadamente 50, 25, 17 ó 10 nucleótidos de longitud.

Se prefiere que se realicen en primer lugar estudios *in vitro* para cuantificar la capacidad del oligonucleótido antisentido para inhibir la expresión génica. Se prefiere que estos  
 5 estudios utilicen controles que distingan entre inhibición génica antisentido y efectos biológicos no específicos de oligonucleótidos. Se prefiere también que estos estudios comparen los niveles de proteína o ARN diana con los de una proteína o ARN control interno. Los resultados obtenidos usando el oligonucleótido antisentido pueden compararse con los obtenidos usando un oligonucleótido control. Se prefiere que el  
 10 oligonucleótido control sea de aproximadamente la misma longitud que el oligonucleótido de prueba y que la secuencia oligonucleotídica del oligonucleótido difiera de la secuencia antisentido no más de lo necesario para impedir la hibridación específica con la secuencia diana.

Los oligonucleótidos antisentido pueden ser ADN o ARN o mezclas quiméricas o  
 15 derivados o versiones modificadas de los mismos, monocatenarios o bicatenarios. El oligonucleótido puede modificarse en el resto de base, el resto de azúcar o la estructura principal de fosfato, por ejemplo, para mejorar la estabilidad de la molécula, la hibridación, etc. El oligonucleótido puede incluir otros grupos unidos tales como péptidos (por ejemplo, para seleccionar como diana receptores de células huésped), o  
 20 agentes que facilitan el transporte a través de la membrana celular (véanse, por ejemplo, Letsinger *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86: 6553-6556, 1989; Lemaitre *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. 84: 648-652, 1987; publicación PCT número WO88/09810) o la barrera hematoencefálica (véase, por ejemplo, el documento WO89/10134), agentes de escisión desencadenada por hibridación (véase, por ejemplo, Krol *et al.*, BioTechniques  
 25 6: 958-976, 1988) o agentes de intercalación (véase, por ejemplo, Zon, Pharm. Res. 5: 539-549, 1988). Para este fin, el oligonucleótido puede conjugarse con otra molécula, por ejemplo, un péptido, un agente de reticulación desencadenada por hibridación, un agente de transporte, un agente de escisión desencadenada por hibridación, etc.

El oligonucleótido antisentido puede comprender al menos un resto de base modificada  
 30 que se selecciona del grupo que incluye pero no se limita a 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-clorouracilo, 5-yodouracilo, hipoxantina, xantina, 4-acetilcitosina, 5-(carboxihidroxietil)uracilo, 5-carboximetilaminometil-2-tiouridina,

5-carboximetilaminometiluracilo, dihidrouracilo, beta-D-galactosolqueosina, inosina, N6-isopenteniladenina, 1-metilguanina, 1-metilosina, 2,2-dimetilguanina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, N6-adenina, 7-metilguanina, 5-metilaminometiluracilo, 5-metoxiaminometil-2-tiouracilo, 5 beta-D-manosilqueosina, 5'-metoxicarboximetiluracilo, 5-metoxiuracilo, 2-metiltio-N6-isopenteniladenina, ácido uracil-5-oxiacético (v), wybutoxosina, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo, éster metílico del ácido uracil-5-oxiacético, ácido uracil-5-oxiacético (v), 5-metil-2-tiouracilo, 3-(3-amino-3-N-2-carboxipropil)uracilo, (acp3)w y 10 2,6-diaminopurina.

El oligonucleótido antisentido puede comprender también al menos un resto de azúcar modificada seleccionada del grupo que incluye pero no se limita a arabinosa, 2-fluoroarabinosa, xilulosa y hexosa. El oligonucleótido antisentido puede contener también una estructura principal similar a péptido neutro. Tales moléculas se 15 denominan oligómeros de ácido nucleico peptídico (PNA) y se describen, por ejemplo, en Perry-O'Keefe *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93: 14670, 1996, y en Eglom *et al.*, Nature 365: 566, 1993. Una ventaja de los oligómeros de PNA es su capacidad para unirse a ADN complementario esencialmente de manera independiente de la fuerza iónica del medio debido a la estructura principal neutra del ADN. Aún en otra 20 realización, el oligonucleótido antisentido comprende al menos una estructura principal de fosfato modificada seleccionada del grupo que consiste en un fosforotioato, un fosforoditioato, un fosforamidotioato, un fosforamidato, un fosforodiamidato, un metilfosfonato, un alquil fosfotriéster y un formacetal o análogos de los mismos.

Aún en otra realización, el oligonucleótido antisentido es un oligonucleótido 25 alfa-anomérico. Un oligonucleótido alfa-anomérico forma híbridos bicatenarios específicos con ARN complementario en los que, al contrario que la orientación antiparalela habitual, las hebras se disponen en paralelo entre sí (Gautier *et al.*, Nucl. Acids Res. 15: 6625-6641, 1987). El oligonucleótido es un 2'-0-metilribonucleótido (Inoue *et al.*, Nucl. Acids Res. 15: 6131-6148, 1987), o un análogo de ARN-ADN 30 quimérico (Inoue *et al.*, FEBS Lett. 215: 327-330, 1987).

Aunque pueden usarse nucleótidos antisentido complementarios a la región codificante de una secuencia de ARNm diana, también pueden usarse aquéllos complementarios a la región no traducida transcrita.

- En ciertos casos, puede ser difícil lograr concentraciones intracelulares del oligonucleótido antisentido suficientes para suprimir la traducción en ARNm endógenos. Por tanto, un enfoque preferido utiliza un constructo de ADN recombinante en el que el oligonucleótido antisentido se coloca bajo el control de un promotor pol III o pol II fuerte. El uso de un constructo de este tipo para transfectar células diana dará como resultado la transcripción de cantidades suficientes de ARN monocatenario que formará pares de bases complementarias con los transcritos de posibles dianas farmacológicas endógenas y de ese modo impedirán la traducción. Por ejemplo, puede introducirse un vector de manera que se tome por una célula y dirija la transcripción de un ARN antisentido. Un vector de este tipo puede permanecer de manera episomal o integrarse cromosómicamente, siempre que pueda transcribirse para producir el ARN antisentido deseado. Tales vectores pueden construirse mediante métodos de tecnología de ADN recombinante convencionales en la técnica. Los vectores pueden ser plásmidos, virales u otros conocidos en la técnica, usados para la replicación y expresión en células de mamífero. La expresión de la secuencia que codifica para el ARN antisentido puede ser mediante cualquier promotor conocido en la técnica que actúa en células de mamífero, preferiblemente humanas. Tales promotores pueden ser inducibles o constitutivos. Tales promotores incluyen pero no se limitan a: la región promotora temprana de SV40 (Bernoist y Chambon, *Nature* 290: 304-310, 1981), el promotor contenido en la repetición terminal larga en 3' del virus del sarcoma de Rous (Yamamoto *et al.*, *Cell* 22: 787-797, 1980), el promotor de timidina cinasa del herpes (Wagner *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78: 1441-1445, 1981), las secuencias reguladoras del gen de la metalotioneína (Brinster *et al.*, *Nature* 296: 39-42, 1982), etc. Puede usarse cualquier tipo de plásmido, cósmido, YAC o vector viral para preparar el constructo de ADN recombinante, que puede introducirse directamente en el sitio del tejido.
- Alternativamente, puede reducirse la expresión del gen diana seleccionando como diana secuencias de desoxirribonucleótidos complementarias a la región reguladora del gen (es decir, el promotor y/o los potenciadores) para formar estructuras de triple hélice que

impidan la transcripción del gen en células diana en el organismo (véase de manera general, Helene, *Anticancer Drug Des.* 6(6): 569-84, 1991; Helene *et al.*, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 660: 27-36, 1992; y Maher, *Bioassays* 14(12): 807-15, 1992).

Las moléculas de ácido nucleico que van a usarse en la formación de la triple hélice para la inhibición de la transcripción son preferiblemente monocatenarias y están compuestas de desoxirribonucleótidos. La composición de bases de estos oligonucleótidos debe promover la formación de la triple hélice por medio de las reglas de apareamiento de bases de Hoogsteen, que generalmente requieren que estén presentes tramos considerables de o bien purinas o bien pirimidinas en una hebra de un dúplex. Las secuencias de nucleótidos pueden ser a base de pirimidina, lo que dará como resultado tripletes de TAT y CGC a través de las tres hebras asociadas de la triple hélice resultante. Las moléculas ricas en pirimidina proporcionan complementariedad de bases a una región rica en purina de una única hebra del dúplex en una orientación paralela con respecto a esa hebra. Además, pueden elegirse moléculas de ácido nucleico que sean ricas en purina, por ejemplo, que contienen un tramo de residuos de G. Estas moléculas formarán una triple hélice con un dúplex de ADN que es rico en pares de GC, en los que la mayoría de los residuos de purina se ubican en una única hebra del dúplex seleccionado como diana, dando como resultado tripletes de CGC a través de las tres hebras del tríplex.

Alternativamente, las posibles secuencias diana que pueden seleccionarse como diana para la formación de la triple hélice pueden aumentarse creando una denominada molécula de ácido nucleico “en zigzag”. Las moléculas en zigzag se sintetizan de manera 5'-3', 3'-5' alternante, de manera que las bases se aparean primero con una hebra de un dúplex y luego con la otra, eliminando la necesidad de que esté presente un tramo considerable de o bien purinas o bien pirimidinas en una hebra de un dúplex.

En ciertas realizaciones, los oligonucleótidos antisentido son antisentidos de morfolino. Los morfolinos son moléculas sintéticas que son el producto de un rediseño de una estructura de ácido nucleico natural. Habitualmente de 25 bases de longitud, se unen a secuencias complementarias de ARN mediante apareamiento de bases de ácido nucleico convencional. Estructuralmente, la diferencia entre los morfolinos y el ADN es que mientras los morfolinos tienen bases de ácido nucleico convencionales, esas bases están unidas a anillos de morfolina en lugar de anillos de desoxirribosa, y se unen a través de



grupos fosforodiamidato en lugar de fosfatos. La sustitución de fosfatos aniónicos por los grupos fosforodiamidato no cargados elimina la ionización en el intervalo de pH fisiológico habitual, de modo que los morfolidos en organismos o células son moléculas no cargadas. Los morfolidos son oligos no quiméricos; toda la estructura principal de un morfolido está compuesta por estas subunidades modificadas. Los morfolidos se usan lo más comúnmente como oligos monocatenarios, aunque pueden usarse heterodúplex de una hebra de morfolido y una hebra de ADN complementaria en combinación con reactivos de suministro citosólicos catiónicos.

A diferencia de muchos tipos estructurales antisentido (por ejemplo, fosforotioatos), los morfolidos no degradan sus moléculas de ARN diana. En su lugar, los morfolidos actúan mediante “bloqueo estérico”, uniéndose a una secuencia diana dentro de un ARN y simplemente poniéndose en el camino de moléculas que de lo contrario podrían interaccionar con el ARN. Los oligos de morfolido se usan a menudo para investigar el papel de un transcrito de ARNm específico en un embrión, tal como huevos o embriones de pez cebra, rana con garras africana (*Xenopus*), pollo y erizo de mar, que producen embriones tratados con morfolido. Con sistemas de suministro citosólico apropiados, los morfolidos son eficaces en cultivo celular.

Unidos a la región no traducida en 5' de un ARN mensajero (ARNm), los morfolidos pueden interferir con la progresión del complejo de iniciación ribosómico desde la caperuza en 5' hasta el codón de iniciación. Esto impide la traducción de la región codificante del transcrito seleccionado como diana (denominado “desactivación” (“*knocking down*”) de la expresión génica). Los morfolidos proporcionan un medio conveniente de “desactivación” de la expresión de la proteína y de aprendizaje de cómo esa desactivación cambia las células o el organismo. Algunos morfolidos desactivan la expresión tan eficazmente que tras la degradación de proteínas preexistentes las proteínas seleccionadas como diana se hacen indetectables mediante inmunotransferencia de tipo Western.

Los morfolidos también pueden interferir con las etapas de procesamiento del pre-ARNm, habitualmente impidiendo que los complejos de snRNP que dirigen el corte y empalme se unan a sus dianas en los límites de los intrones en una hebra de pre-ARN. Impedir que U1 (en el sitio donador) o U2/U5 (en el resto polipirimidina y el sitio aceptor) se unan puede provocar un corte y empalme modificado, conduciendo

comúnmente a exclusiones de exones del ARNm maduro. La selección como diana de algunas dianas de corte y empalme da como resultado inclusiones de intrones, mientras que la activación de sitios de corte y empalme crípticos puede conducir a exclusiones o inclusiones parciales. Las dianas de snRNP U11/U12 también pueden bloquearse. La modificación del corte y empalme puede someterse a ensayo de manera conveniente mediante reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) y se observa como un desplazamiento de las bandas tras la electroforesis en gel de los productos de RT-PCR.

Se han usado también morfolinos para bloquear la actividad del ARNmi, la actividad de ribozimas, silenciadores de corte y empalme intrónicos y potenciadores de corte y empalme. Se han inhibido las funciones de las snRNP U2 y U12 mediante morfolinos. Los morfolinos dirigidos a secuencias de ARNm “resbaladizas” (“*slippery*”) dentro de regiones que codifican para proteínas pueden inducir desplazamientos del marco traduccional. Las actividades de los morfolinos frente a esta variedad de dianas sugieren que los morfolinos pueden usarse como herramienta de propósito general para bloquear interacciones de proteínas o ácidos nucleicos con el ARNm.

En una realización particular, el inhibidor del receptor TRPA1 se selecciona de los compuestos de la tabla I, incluyendo combinaciones de los mismos. En una realización preferida, el inhibidor del receptor TRPA1 se selecciona del grupo que consiste en 2-(1,3-dimetil-2,6-dioxo-1,2,3,6-tetrahidro-7H-purin-7-il)-N-(4-isopropilfenil)acetamida (comúnmente conocido como HC-030031), oxima de 4-(4-clorofenil)-3-metil-3-buten-2-ona (comúnmente conocido como AP18), alcanfor, mentol, gadolinio, rojo de rutenio, gentamicina y amilorida.

Las cantidades eficaces del inhibidor del receptor TRPA1 dependerán del modo de administración, la frecuencia de administración, la naturaleza del tratamiento, la edad y el estado del individuo que va a tratarse, y del tipo de composición farmacéutica usada para suministrar el compuesto en un sistema vivo. Niveles eficaces de inhibidor del receptor TRPA1 pueden oscilar desde 50 nM hasta 5  $\mu$ M (administrado a animales experimentales como 20-30 mg/kg dos veces al día durante diez días), dependiendo del compuesto, el sistema, los criterios de valoración experimentales y clínicos y los umbrales de toxicidad. Aunque las dosis individuales varían, un experto en la técnica puede determinar intervalos óptimos de cantidades eficaces. Para inhibidores del

receptor TRPA1 que están implicados en ensayos clínicos para otras indicaciones, pueden considerarse las dosificaciones seguras y eficaces identificadas en tales ensayos cuando se seleccionan dosificaciones para tratamientos según la presente invención.

El inhibidor del receptor TRPA1 usado según los métodos de la presente invención  
5 puede administrarse solo o como una composición farmacéutica, que incluye el/los compuesto(s) y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los bloqueantes del receptor TRPA1 se proporcionan normalmente como una composición farmacéutica. La composición farmacéutica puede incluir también excipientes adecuados, o estabilizadores, y puede estar en forma líquida o sólida tal como comprimidos, cápsulas,  
10 polvos, disoluciones, suspensiones o emulsiones. Normalmente, la composición contendrá de desde aproximadamente el 0,01 hasta el 99 por ciento, preferiblemente desde aproximadamente el 5 hasta el 95 por ciento de compuesto(s) activo(s), junto con el vehículo.

El inhibidor del receptor TRPA1, cuando se combina con vehículos, excipientes o  
15 estabilizadores farmacéutica o fisiológicamente aceptables, ya sea en forma sólida o líquida tal como comprimidos, cápsulas, polvos, disoluciones, suspensiones o emulsiones, puede administrarse por vía oral, por vía parenteral, por vía subcutánea, por vía intravenosa, por vía intramuscular, por vía intraperitoneal, mediante instilación intranasal, mediante implantación, mediante instilación intravesical o intracavitaria, por  
20 vía intraocular, por vía intraarterial, por vía intralesional, por vía transdérmica o mediante aplicación a membranas mucosas, tales como las de la nariz, la garganta y los tubos bronquiales (es decir, inhalación).

Para la mayoría de los fines terapéuticos, el inhibidor del receptor TRPA1 puede administrarse por vía oral como un sólido o como una disolución o suspensión en forma  
25 líquida, por medio de inyección como una disolución o suspensión en forma líquida, o por medio de inhalación de una disolución o suspensión nebulizada. Las formas farmacéuticas unitarias sólidas pueden ser del tipo convencional. La forma sólida puede ser una cápsula, tal como un tipo de gelatina ordinario que contiene los compuestos de la presente invención y un vehículo, por ejemplo, lubricantes y cargas inertes tales como  
30 lactosa, sacarosa o almidón de maíz. En otra realización, estos compuestos se preparan en comprimidos con bases de comprimidos convencionales tales como lactosa, sacarosa o almidón de maíz en combinación con aglutinantes como goma arábica, almidón de

maíz o gelatina, agentes disgregantes, tales como almidón de maíz, almidón de patata o ácido algínico, y un lubricante, como ácido esteárico o estearato de magnesio.

Para dosificaciones inyectables, pueden prepararse disoluciones o suspensiones de estos materiales en un diluyente fisiológicamente aceptable con un vehículo farmacéutico.

- 5 Tales vehículos incluyen líquidos estériles, tales como agua y aceites, con o sin la adición de un tensioactivo y otro vehículo farmacéutica y fisiológicamente aceptable, incluyendo adyuvantes, excipientes o estabilizadores. Aceites ilustrativos son los de origen sintético, vegetal, animal o del petróleo, por ejemplo, aceite de cacahuete, aceite de soja o aceite mineral. En general, agua, solución salina, dextrosa acuosa y disolución  
10 de azúcar relacionada, y glicoles tales como propilenglicol o polietilenglicol son vehículos líquidos preferidos, particularmente para disoluciones inyectables.

- Para su uso como aerosoles, el compuesto en disolución o suspensión puede envasarse en un recipiente de aerosol presurizado junto con propelentes adecuados, por ejemplo, propelentes hidrocarbonados como propano, butano o isobutano con adyuvantes  
15 convencionales. Los materiales de la presente invención también pueden administrarse en forma no presurizada tal como en un nebulizador o atomizador.

- Para vías transdérmicas, el compuesto está presente en un vehículo que forma una composición en forma de una crema, loción, disolución y/o emulsión. La composición puede incluirse en un parche transdérmico del tipo de matriz o depósito tal como son  
20 convencionales en la técnica para este fin.

Se contempla el uso de combinaciones de inhibidores del receptor TRPA1 descritos en la tabla I.

- Se contempla también que la administración del inhibidor del receptor TRPA1 pueda llevarse a cabo en combinación con otros tratamientos terapéuticos adecuados que son  
25 útiles para tratar una enfermedad ocasionada por una infección bacteriana o por exposición a endotoxinas bacterianas. Por tanto, en otra realización, el inhibidor del receptor TRPA1 puede combinarse con otros fármacos para el tratamiento de una enfermedad ocasionada por una infección bacteriana o por exposición a endotoxinas bacterianas. Ejemplos de estos fármacos son agentes antibióticos, agentes antivirales,  
30 agentes antifúngicos, agentes antiparasíticos, corticoesteroides, fármacos

antiinflamatorios no esteroides, fármacos que modifican la neovascularización, antihistamínicos, neuropéptidos, neuromoduladores y bloqueantes del canal de Na<sup>+</sup>.

En el contexto de la presente invención, por infección bacteriana se entiende aquella condición bajo la cual un organismo es invadido por un material extraño, en particular  
5 una bacteria. El resultado de una infección bacteriana puede incluir el crecimiento de la bacteria, la producción de toxinas y el daño al organismo infectado.

La infección bacteriana puede ser causada por bacterias gram positivas o gram negativas. Ejemplos de bacterias gram positivas y gram negativas se citan en el documento WO2009/020643.

10 En una realización particular, la infección bacteriana es causada por bacterias gram negativas, preferentemente por *Escherichia coli*.

Ejemplos de infecciones bacterianas incluyen infecciones del tracto urinario, infecciones del tracto respiratorio, infecciones del tejido dérmico, infecciones del plasma sanguíneo, infecciones estomacales e intestinales o infecciones del sistema  
15 nervioso central.

De forma aún más preferente, la infección bacteriana es causada por los lipopolisacáridos (LPS) procedentes de la membrana externa de la bacteria *Escherichia coli*.

El LPS puede inducir varias reacciones potencialmente letales, incluyendo una fuerte  
20 estimulación de la respuesta inmune, la constricción de las vías respiratorias y una vasodilatación arterial que puede llevar a una severa caída en la presión arterial. Además, el LPS puede inducir síntomas de irritación y dolor que acompañan a muchas infecciones bacterianas tópicas y sistémicas. El dolor agudo y crónico es un síntoma muy frecuente en la meningitis, la pulpitis, el dolor de las heridas infectadas, cistitis  
25 bacteriana, la prostatitis crónica y el dolor abdominal crónico en el síndrome de intestino irritable post-infeccioso.

En particular, el LPS puede inducir sepsis o shock séptico, una severa enfermedad causada por una infección del flujo sanguíneo como consecuencia de las toxinas producidas por las bacterias. Esta infección bacteriana puede originarse en cualquier  
30 parte del cuerpo, no obstante es más común en riñones, hígado o vesícula biliar, intestino, piel y pulmones. Dicha infección ocurre asimismo en pacientes

hospitalizados, y los lugares comunes de infección incluyen las vías intravenosas, las heridas quirúrgicas, los drenajes quirúrgicos, úlceras y escaras. La sepsis conlleva una severa caída de la presión arterial (hipotensión) provocando un shock.

Por tanto, enfermedades causadas por infecciones bacterianas pueden ser dolor, en particular dolor agudo, dolor crónico, dolor nociceptivo y dolor inflamatorio, e hipotensión asociada al shock séptico.

El LPS es una endotoxina bacteriana que también puede ser adquirida por la exposición al aire contaminado, al polvo orgánico y al polvo en los hogares, lo que influye en la exacerbación de los síntomas del asma. Asimismo, está presente en el humo de los cigarrillos. La exposición al LPS provoca una respuesta inflamatoria acompañada de hipersensibilidad en las vías respiratorias lo que contribuye a la etiología y/o exacerbación de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica. Además, se postula que puede contribuir a la patogénesis de la bronquitis crónica que se desarrolla en fumadores activos y pasivos.

Por tanto, en una realización particular de la presente invención, los inhibidores de TRPA1 se utilizan en la preparación de un medicamento dirigido al tratamiento de enfermedades causadas por exposición a endotoxinas bacterianas. Dichas enfermedades incluyen, por ejemplo, el asma, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica y la bronquitis crónica en fumadores activos y pasivos.

Por otra parte, algunos tipos de LPS o derivados de los mismos son utilizados como adyuvantes en vacunas por su capacidad inmunogénica. No obstante, resultan tóxicos y en muchos casos provocan una respuesta inflamatoria severa, postulándose además que estimulan los nervios aferentes sensoriales, dando lugar a una sensibilización de la respuesta inmune.

Por tanto, en otra realización particular de la presente invención, las enfermedades causadas por exposición a endotoxinas bacterianas son enfermedades de tipo inflamatorio causadas por el uso de endotoxinas como adyuvantes en vacunas.

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos, los cuales no pretenden ser limitativos de su alcance.

30

## Ejemplos

### Ejemplo 1. Estimulación del TRPA1 nativo de nociceptores mediante LPS.

Mediante el uso de fluorimetría de calcio intracelular  $[Ca^{2+}]_i$  basada en el fluoróforo fura-2, se encontró que extractos del LPS de *E.coli* (10  $\mu$ g/ml) producen un incremento de la  $[Ca^{2+}]_i$  en el 17.8% (32/180) de las neuronas de cultivos primarios obtenidos a partir de ganglios nodosos de ratones con fenotipo silvestre (WT) (Fig. 1A and 1D). Cabe destacar, que las neuronas del nodoso procedentes de ratones nulos para la expresión del receptor TLR4 (*Tlr4* KO) respondieron con una incidencia (32/136,  $p = 0.26$ ; Fig. 1B and 1D) y amplitud similares ( $p = 0.6$ ), lo que sugiere que los efectos observados durante la aplicación del LPS en neuronas sensoriales del nodoso, no están mediados por TLR4. Además, la mayor parte de neuronas WT y *Tlr4* KO que respondieron al LPS, también lo hicieron a cinamaldehído (100  $\mu$ M) y a capsaicina (100 nM) (Fig. 1A-B and D), lo que indica que son neuronas nociceptoras polimodales (Story G. M. y col., *Cell*, 2003, 112, 819-829; Jordt S. E. y col., *Nature*, 2004, 427, 260-265) y sugiere que las respuestas neuronales al LPS son mediadas por el canal iónico TRPA1, el quimionociceptor de un gran abanico de compuestos con propiedades irritantes (Peterlin Z. y col., *Neuron*, 2007, 53, 635-638; Bautista D. M. y col., *Cell*, 2006, 124, 1269-1282). Incluso, se encontró que las neuronas del nodoso de ratones *Trpa1* KO respondieron al LPS con una incidencia significativamente menor ( $p = 8 \times 10^{-4}$ ; Fig. 1C and 1D) además de una menor amplitud ( $p = 0.01$ ) que las neuronas WT. Los experimentos realizados con neuronas sensoriales trigeminales (TG) arrojaron unos resultados similares, con un gran solapamiento de la población de neuronas sensibles al LPS y a cinamaldehído en el WT (82.3%, 28/34) y una drástica reducción en la incidencia ( $p = 2 \times 10^{-4}$ ; Fig. 1D) y amplitud ( $p = 0.02$ ) de las respuestas al LPS en ratones TRPA1 KO frente al WT. Además, la pre-aplicación de HC-030031, un conocido inhibidor de TRPA1 (McNamara C. R. y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2007, 104, 13525-13530), abolió enormemente las respuestas al LPS en neuronas trigeminales ( $p < 10^{-4}$ ; Fig. 1D), mientras que el lavado del inhibidor permitió la aparición de las respuestas inducidas por el LPS, principalmente en neuronas sensibles a cinamaldehído (94%) (Fig. 1D). Es destacable que las respuestas al LPS en neuronas viscerales de ratones nulos para la expresión de TRPV1 *Trpv1* KO mice, fueron robustas ( $p = 0.42$ , datos no mostrados) y casi tan frecuentes (25/187,  $P = 0.2527$ )

como en los ratones WT (Fig. 1D), lo que indica que TRPV1 no es la diana primaria del LPS en los nociceptores.

Para analizar la acción del LPS sobre neuronas sensoriales en un contexto más fisiológico, se realizaron registros electrofisiológicos extracelulares en una preparación *ex-vivo* de nervio lingual de la rama V3 del trigémino. La aplicación del LPS sobre el campo receptor de fibras nociceptoras que previamente habían respondido a estímulo mecánico y calor intenso, produjo un incremento significativo de la frecuencia de disparo en el 50 % de ellas, precisamente aquellas que fueron activadas por el aceite de mostaza, un conocido agonista de TRPA1 (Fig. 1E, F). Colectivamente, estos resultados, demuestran que el canal iónico TRPA1, pero no el receptor canónico del LPS, TLR4, es crítico para la mediación de los efectos agudos excitadores que el LPS produce en neuronas nociceptoras.

#### Ejemplo 2. Estimulación del TRPA1 recombinante de ratón y humano mediante LPS

Se examinó si el LPS estimula el canal iónico TRPA1. A tal efecto, se midieron los cambios de la  $[Ca^{2+}]_i$  en células CHO (Chinese ovary cells) que expresan de forma heteróloga el TRPA1 de ratón (células CHO-A1) (Story G. M. y col., *Cell*, 2003, 112, 819-829). El LPS indujo un incremento reversible y dependiente de la dosis aplicada en células CHO-A1, con una concentración efectiva ( $EC_{50}$ ) de  $3.3 \pm 0.5 \mu\text{g/ml}$  (Fig. 2A, B). La estimulación inducida por el LPS no se observó en ausencia de  $Ca^{2+}$  extracelular (1 mM EGTA, datos no mostrados), lo que demuestra que este efecto del LPS está mediado por el paso de  $Ca^{2+}$  a través de canales iónicos TRPA1 y no por la liberación de depósitos intracelulares. Cabe destacar, que en células transfectadas con canales iónicos TRP humanos, el LPS también estimuló TRPA1, pero resultó inefectivo en la estimulación de otros canales iónicos TRP que se expresan en neuronas sensoriales nociceptoras, como son el receptor vaniloide TRPV1, el receptor de mentol TRPM8 y el receptor activado por  $\delta$ 9-tetrahidrocannabinol TRPV2 (datos no mostrados).

La estimulación de TRPA1 por el LPS se confirmó en experimentos de patch-clamp mediante la configuración de célula entera, en los cuáles, la aplicación extracelular de LPS (20  $\mu\text{g/ml}$ ) incrementó la amplitud de las corrientes registradas en células CHO-A1 (Fig. 2C, D), pero fue inefectiva en células CHO sin transfectar (Fig. 2D). Además, el inhibidor específico de TRPA1, HC-030031, evitó totalmente y/o revirtió el incremento producido por el LPS de la corriente mediada por canales iónicos TRPA1 (Fig. 2E). En



conjunto, estos resultados demuestran que el LPS activa directamente TRPA1.

### Ejemplo 3. Evidencias sobre el mecanismo de interacción del LPS y TRPA1.

Se exploró el mecanismo(s) por el que el LPS estimula TRPA1. Este canal iónico puede ser activado por la modificación covalente de los aminoácidos del dominio intracelular N-terminal por compuestos electrofílicos y por iones calcio permeantes (Viana F. y Ferrer-Montiel A., *Expert. Opin. Ther. Pat.*, 2009, 19, 1787-1799). Sin embargo, es poco probable que ninguno de estos mecanismos medie los efectos del LPS. El LPS no es un reactivo electrofílico y estimula a TRPA1 en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\Delta I = -67 \pm 18$  pA at -75 mV,  $p = 0.014$ ;  $144 \pm 18$  pA at +50 mV,  $p = 0.0004$ ;  $n = 6$ ; paired T test; Fig. 3A). Por otro lado, el LPS indujo un cambio significativo hacia la izquierda de la dependencia de voltaje de la activación de TRPA1 (Fig. 3B), retrasando el cierre del canal y acelerando la apertura (datos no mostrados), demostrando que, al igual que ocurre con otros agonistas no electrofílicos (Karashima Y. y col., *J. Neurosci.*, 2007, 27, 9874-9884; Fajardo O., Meseguer V. y col., *Channels*, 2008, 2, 429-438; Talavera K. y col., *Nat. Neurosci.*, 2009, 12, 1293-1299), el LPS estabiliza el estado abierto de TRPA1.

Es bien conocido que las acciones biológicas del LPS y la activación de TRPA1 se modula por moléculas anfipáticas que producen un estrés mecánico en la membrana plasmática (Hill K. y Schaefer M., *J. Biol. Chem.*, 2007, 282, 7145-7153); Seydel U., y col., *J. Endotoxin. Res.*, 2001, 7, 243-247). De acuerdo con estas observaciones, se encontró una fuerte influencia del trinitrofenol (TNP), un compuesto anfipático con carga negativa que induce crenación de la membrana plasmática, sobre las respuestas mediadas por TRPA1 en respuesta al LPS. El pretratamiento con trinitrofenol, potenció las respuestas de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  evocadas por bajas concentraciones de LPS en células CHO-A1 (Fig. 3C). La sospecha de que la inserción del LPS en la membrana plasmática es responsable de su acción estimuladora sobre TRPA1, nos llevó a ensayar los efectos del lípido A, que es el componente lipídico de anclaje a la membrana que forma el elemento biológicamente activo de la molécula del LPS Raetz C. R., y col., *Annu. Rev. Biochem.*, 2007, 76, 295-329). La aplicación de 10-50  $\mu\text{g/ml}$  de lípido A indujo respuestas dependientes de la dosis aplicada en células CHO-A1, pero no en las células control (Fig. 3D).

La conformación tridimensional del lípido A, resulta crucial para la actividad biológica del LPS (Ej: producción de citoquinas), y está determinada en gran medida por el

número de ácidos grasos y de grupos fosfato que determinan la carga neta negativa de la molécula. En este sentido, las moléculas de LPS que contienen un lípido A cónico son más activas biológicamente que aquellas que lo tienen cilíndrico (Raetz C. R., y col., *Annu. Rev. Biochem.*, 2007, 76, 295-329); Brandenburg K., y col., *Subcell. Biochem.*, 2010, 53, 53-67). Se aplicaron varios LPS de lípido A cónico (hexaacyl asimétrico) procedentes de *E. coli*, *S. typhimurium* and *K. pneumoniae*, sobre células CHO-A1, e indujeron las respuestas más potentes (Fig. 3E and F) en comparación con aquellos procedentes de *S. marcescens* y *P. aeruginosa*, que tienen un lípido A cilíndrico (pentaacyl), y el LPS de *N. meningitidis*, cilíndrico (hexaacyl simétrico), que no mostró un efecto significativo sobre TRPA1. Colectivamente, estos datos sugieren que la mayor capacidad de un LPS determinado, de inducir alteraciones mecánicas de la membrana plasmática, se corresponde con una mayor capacidad para activar TRPA1.

#### Ejemplo 4. Contribución de TRPA1 a las respuestas evocadas por el LPS *in vivo*.

Con el objetivo de determinar la contribución de TRPA1 a los conocidos efectos del LPS *in vivo*, se usaron herramientas genéticas y farmacológicas como son los ratones nulos para la expresión de TRPA1, y el inhibidor de TRPA1, HC030031. La exposición al LPS, que está presente en el polvo orgánico o que es liberado durante infecciones bacterianas de las vías respiratorias, produce inflamación (Michel O. y col., *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 1996, 154, 1641-1646). Mediante el uso de pletismografía de cuerpo entero, se midió la función ventilatoria de ratones WT y *Trpa1* KO expuestos a un aerosol que contenía LPS de *E.coli*. De este modo se confirmó que el LPS inhalado induce un incremento del Penh (Wu Y. Z y col., *Respir. Res.*, 2010, 11, 49), un indicador funcional de la constricción de las vías respiratorias (Fig. 4A). Curiosamente, los ratones *Trpa1* KO también respondieron a la administración de LPS, pero en términos comparativos, las respuestas ventilatorias fueron más tardías, de menor amplitud y revirtieron más rápidamente. Adicionalmente, se encontraron evidencias de un componente neurogénico de las respuestas ventilatorias al LPS, que está mediado por TRPA1. En este sentido, en ratones WT, el LPS indujo un aumento significativo de la pausa inspiratoria (EIP) y/o de la pausa espiratoria (EEP), las cuáles son parámetros indicadores de irritación debida a la activación de las fibras aferentes sensoriales que inervan las vías respiratorias superiores e inferiores, respectivamente (Vijayaraghavan R. y col., *Arch. Toxicol.*, 1994, 68, 490-499). Por el contrario, en ratones *Trpa1* KO, los

incrementos de la EIP y de la EEP fueron significativamente menores respecto del WT (Fig. 4B y 4C). En conjunto, estos datos indican que la estimulación directa de TRPA1 en terminales nerviosas nociceptoras, contribuye a la constricción de las vías respiratorias y a la irritación producida en respuesta a LPS.

- 5 La infección sistémica bacteriana puede conllevar vasodilatación periférica y consecuentemente una disminución de la presión arterial, lo que supone una condición fisiológica comprometedora de la vida, conocida como choque séptico (Landry D. W. y Oliver J. A., *N. Engl. J. Med.*, 2001, 345, 588-595). Teniendo en cuenta que la estimulación química de TRPA1 en fibras sensoriales que inervan arterias induce una
- 10 potente vasodilatación (Pozsgai G. y col., *Cardiovasc. Res.*, 2010, 87, 760-768, se ensayó si este canal iónico está implicado en las respuestas vasculares al LPS. Mediante el uso de un miógrafo para pequeños vasos *ex vivo*, se encontró que el LPS (100 µg/ml) indujo una potente dilatación en arteria mesentéricas de ratones WT que previamente habían sido contraídas con un agonista beta adrenérgico, en concreto con fenilefrina (2
- 15 µM) (Fig. 4D). Es destacable que este efecto se redujo de manera significativa en presencia del inhibidor específico de TRPA1, HC-030031 (10 µM), y por la ablación genética de TRPA1 (Fig. 4D). Además, en los ratones *Trpa1* KO, la dilatación remanente inducida por el LPS fue insensible a HC-030031 (Fig. 4D). Por tanto, TRPA1 participa en la respuesta vasodilatadora inducida por el LPS, aunque otras
- 20 dianas moleculares que aún no han sido identificadas también contribuirían a estas respuestas vasculares.

- Los síntomas típicos de las infecciones locales por bacterias Gram-negativas, tales como el dolor, la inflamación y la hipersensibilidad mecánica (Ferreira, S. y col., *Br.J.Pharmacol.*, 1993, 110, 1227-1231; Kanaan S. A. y col., *Pain*, 1996, 66, 373-379)
- 25 fueron reproducidos experimentalmente mediante inyecciones intraplantares del LPS de *E. coli* en ratones WT (Fig. 4E-G). De manera consistente con el papel principal que TRPA1 tiene en la detección del LPS, los ratones *Trpa1* KO mostraron respuestas atenuadas con respecto al WT, y adicionalmente, la inflamación causada por diferentes tipos de LPS, en función de la forma del lípido A, mostró una alta correlación con la
  - 30 capacidad de éstos para estimular mTRPA1 *in vitro* ( $r = 0.94$ ; Fig. 4G).

En resumen, los resultados obtenidos indican que el LPS activa el receptor TRPA1 y este canal iónico media en gran parte los efectos nocivos producidos por las endotoxinas bacterianas *in vivo*.

## REIVINDICACIONES

1. Uso de un inhibidor de TRPA1 o de un inhibidor de una variante funcionalmente equivalente de dicha proteína, en la preparación de un medicamento dirigido al tratamiento o prevención de enfermedades o disfunciones producidas por infecciones bacterianas o por exposición a endotoxinas bacterianas.
- 5 2. Uso según reivindicación 1, donde las infecciones bacterianas son causadas por bacterias gram negativas.
3. Uso según reivindicación 1 ó 2, donde las infecciones bacterianas son causadas por la bacteria *Escherichia coli*.
4. Uso según reivindicación 3, donde las infecciones bacterianas son causadas por los  
10 lipopolisacáridos procedentes de la membrana externa de la bacteria *Escherichia coli*.
5. Uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde las infecciones bacterianas se seleccionan entre infecciones del tracto urinario, infecciones del tracto respiratorio, infecciones del tejido dérmico, infecciones del plasma  
15 sanguíneo, infecciones estomacales e intestinales o infecciones del sistema nervioso central o periférico.
6. Uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde las enfermedades o disfunciones producidas por infecciones bacterianas se seleccionan entre dolor agudo, dolor crónico, dolor abdominal, dolor nociceptivo, dolor inflamatorio e  
20 hipotensión asociada al shock séptico.
7. Uso según reivindicación 6, donde el dolor agudo y crónico es ocasionado por meningitis, pulpitis, dolor de heridas infectadas, cistitis bacteriana o prostatitis crónica.
8. Uso según reivindicación 6, donde el dolor abdominal es ocasionado por el  
25 síndrome de intestino irritable post-infeccioso.
9. Uso según reivindicación 1, donde las enfermedades o disfunciones producidas por la exposición a endotoxinas bacterianas se seleccionan entre asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica y bronquitis crónica en fumadores activos y pasivos.
10. Uso según reivindicación 1, donde las enfermedades o disfunciones producidas por  
30 la exposición a endotoxinas bacterianas son enfermedades de tipo inflamatorio causadas por el uso de endotoxinas como adyuvantes en vacunas.

11. Uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el inhibidor de TRPA1 se selecciona del grupo que consiste en 2-(1,3-dimetil-2,6-dioxo-1,2,3,6-tetrahidro-7H-purin-7-il)-N-(4-isopropilfenil)acetamida (HC-030031), oxima de 4-(4-clorofenil)-3-metil-3-buten-2-ona (AP18), alcanfor, mentol, gadolinio, rojo de rutenio, gentamicina, amilorida y combinaciones de los mismos.
12. Uso según reivindicación 11, donde el inhibidor de TRPA1 es 2-(1,3-dimetil-2,6-dioxo-1,2,3,6-tetrahidro-7H-purin-7-il)-N-(4-isopropilfenil)acetamida (HC-030031).
13. Uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el inhibidor de TRPA1 se administra en combinación con un agente terapéutico adecuado para el tratamiento de una enfermedad producida por una infección bacteriana o por exposición a endotoxinas bacterianas.
14. Uso según reivindicación 13, donde el agente terapéutico se selecciona entre un analgésico, un antibiótico, un antifúngico, un corticosteroide, un fármaco antiinflamatorio no esteroide, un fármaco que modifican la neovascularización, un antihistamínico, un neuropéptido, un neuromodulador y un bloqueante del canal de Na<sup>+</sup>.
15. Un inhibidor de TRPA1 o un inhibidor de una variante funcionalmente equivalente de TRPA1 para su uso en el tratamiento o prevención de enfermedades o disfunciones producidas por infecciones bacterianas o por exposición a endotoxinas bacterianas.

Figura 1

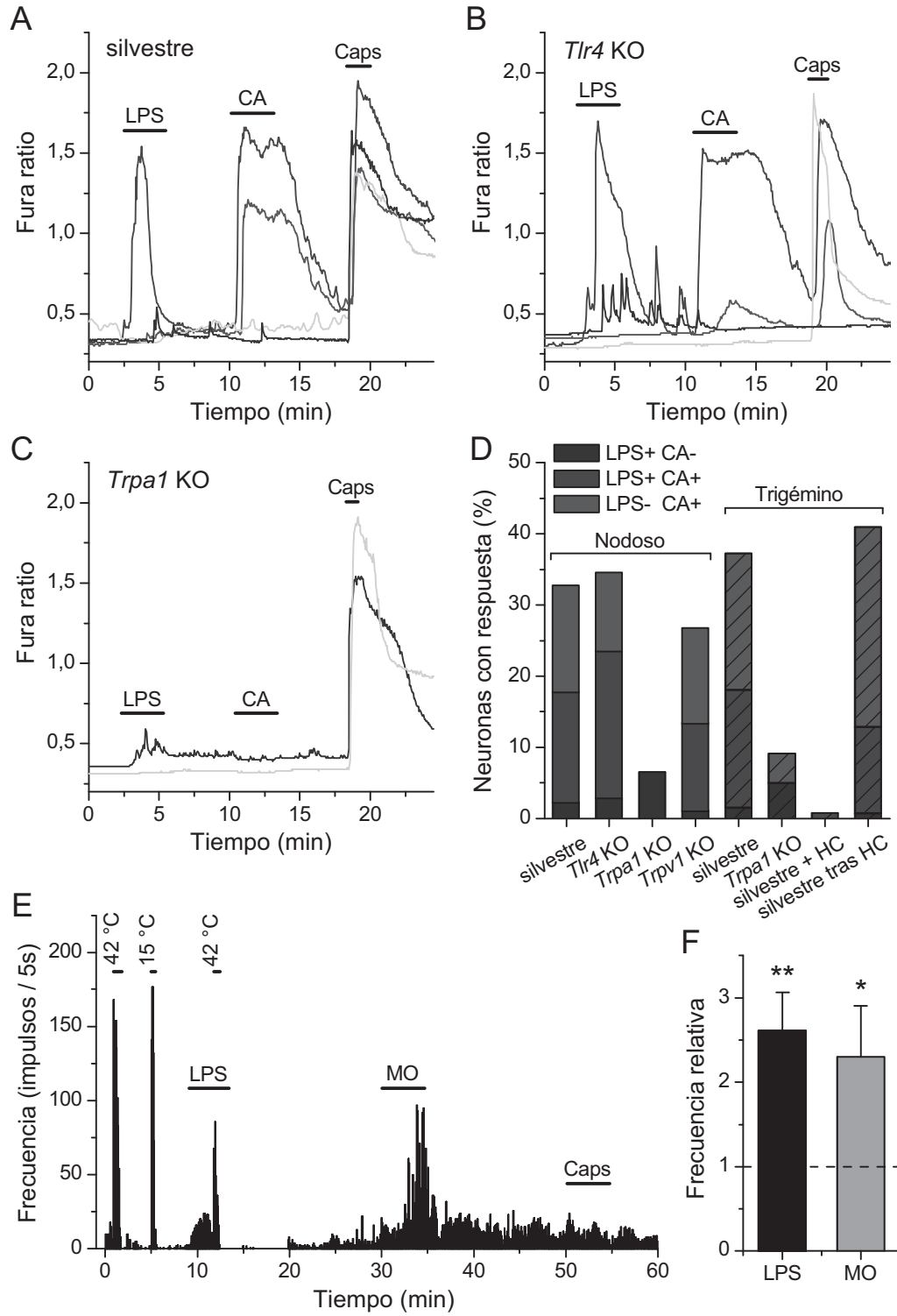


Figura 2

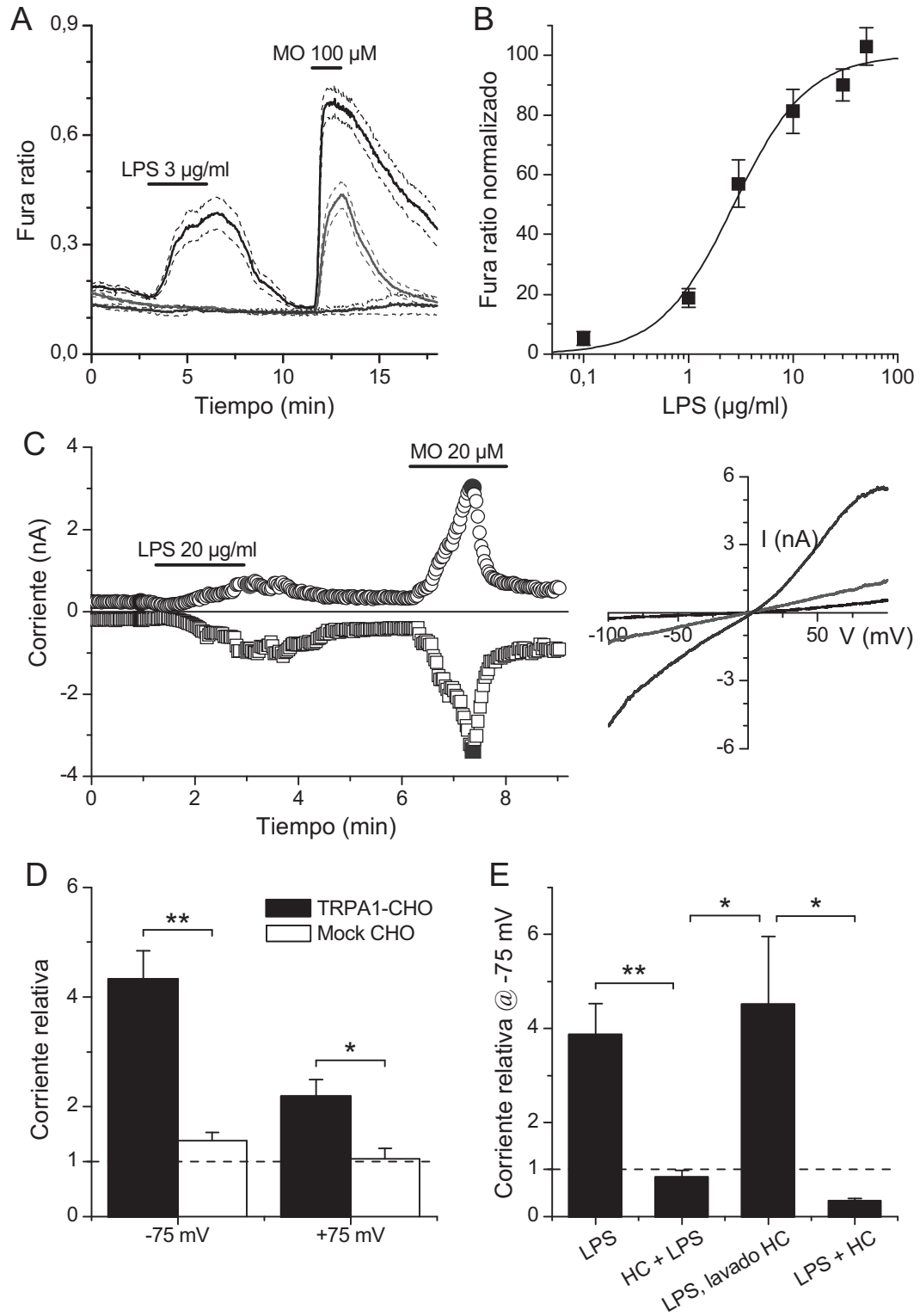




Figura 3

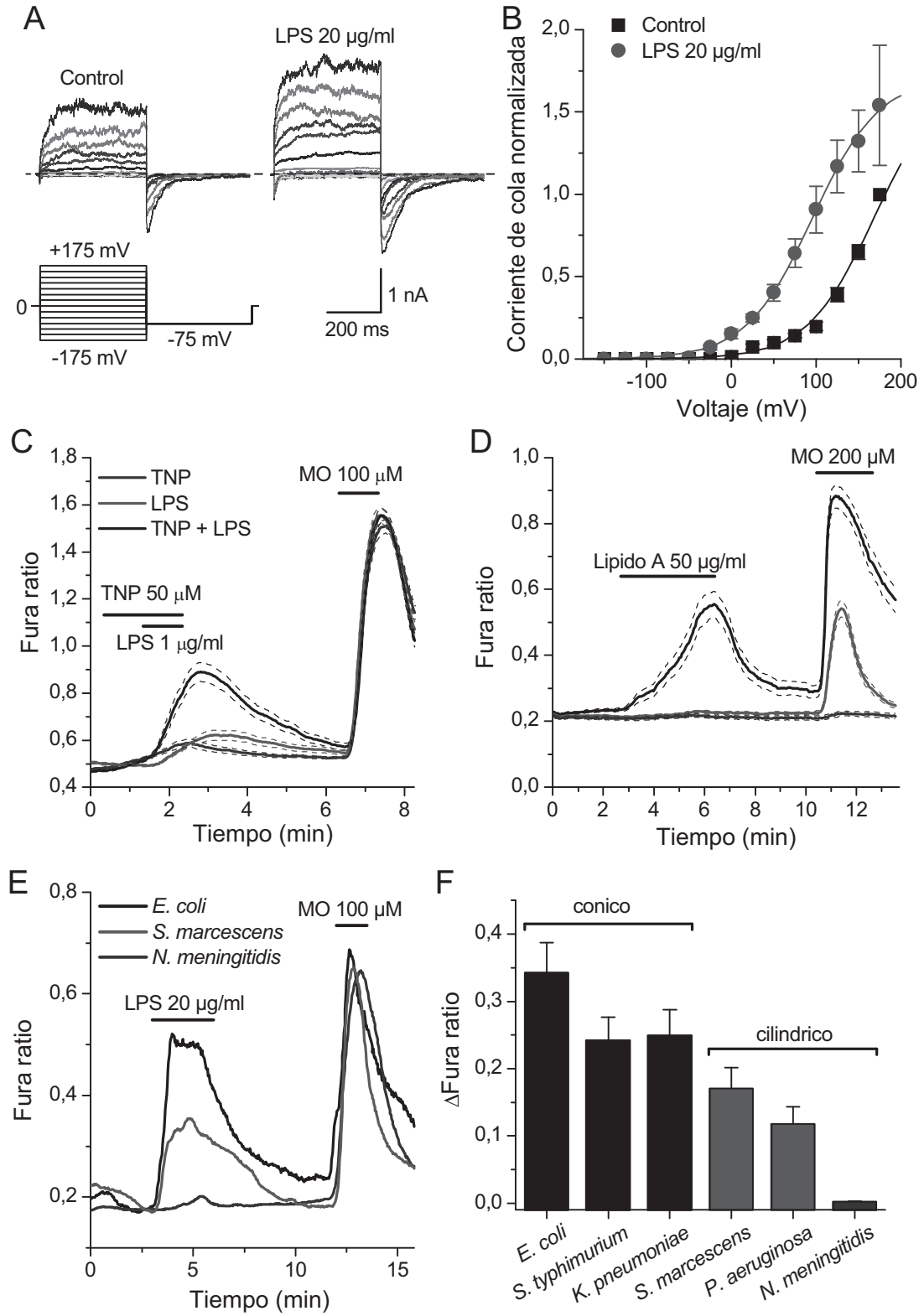
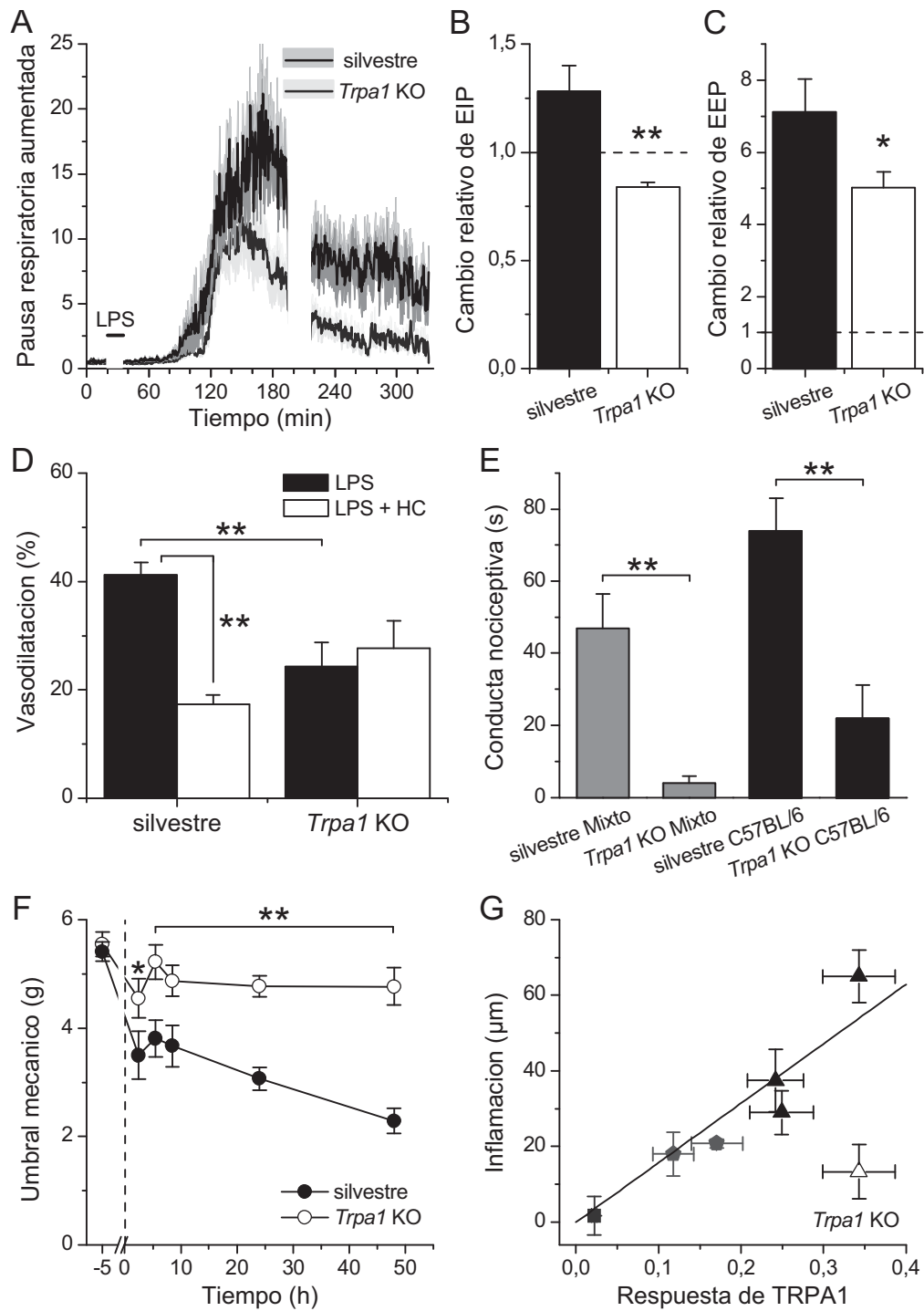


Figura 4



# ES 2 412 955 A1

## LISTA DE SECUENCIAS

<110> UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE  
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

<120> USO DE ANTAGONISTAS DEL RECEPTOR TRPA1 PARA EL TRATAMIENTO DE  
ENFERMEDADES ASOCIADAS A INFECCIONES BACTERIANAS

<130> P7110ES00

<160> 2

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1  
<211> 1119  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Lys Arg Ser Leu Arg Lys Met Trp Arg Pro Gly Glu Lys Lys Glu  
1 5 10 15

Pro Gln Gly Val Val Tyr Glu Asp Val Pro Asp Asp Thr Glu Asp Phe  
20 25 30

Lys Glu Ser Leu Lys Val Val Phe Glu Gly Ser Ala Tyr Gly Leu Gln  
35 40 45

Asn Phe Asn Lys Gln Lys Lys Leu Lys Arg Cys Asp Asp Met Asp Thr  
50 55 60

Phe Phe Leu His Tyr Ala Ala Ala Glu Gly Gln Ile Glu Leu Met Glu  
65 70 75 80

Lys Ile Thr Arg Asp Ser Ser Leu Glu Val Leu His Glu Met Asp Asp  
85 90 95

Tyr Gly Asn Thr Pro Leu His Cys Ala Val Glu Lys Asn Gln Ile Glu  
100 105 110

Ser Val Lys Phe Leu Leu Ser Arg Gly Ala Asn Pro Asn Leu Arg Asn  
115 120 125

Phe Asn Met Met Ala Pro Leu His Ile Ala Val Gln Gly Met Asn Asn  
130 135 140

Glu Val Met Lys Val Leu Leu Glu His Arg Thr Ile Asp Val Asn Leu  
145 150 155 160

# ES 2 412 955 A1

Glu Gly Glu Asn Gly Asn Thr Ala Val Ile Ile Ala Cys Thr Thr Asn  
165 170 175

Asn Ser Glu Ala Leu Gln Ile Leu Leu Lys Lys Gly Ala Lys Pro Cys  
180 185 190

Lys Ser Asn Lys Trp Gly Cys Phe Pro Ile His Gln Ala Ala Phe Ser  
195 200 205

Gly Ser Lys Glu Cys Met Glu Ile Ile Leu Arg Phe Gly Glu Glu His  
210 215 220

Gly Tyr Ser Arg Gln Leu His Ile Asn Phe Met Asn Asn Gly Lys Ala  
225 230 235 240

Thr Pro Leu His Leu Ala Val Gln Asn Gly Asp Leu Glu Met Ile Lys  
245 250 255

Met Cys Leu Asp Asn Gly Ala Gln Ile Asp Pro Val Glu Lys Gly Arg  
260 265 270

Cys Thr Ala Ile His Phe Ala Ala Thr Gln Gly Ala Thr Glu Ile Val  
275 280 285

Lys Leu Met Ile Ser Ser Tyr Ser Gly Ser Val Asp Ile Val Asn Thr  
290 295 300

Thr Asp Gly Cys His Glu Thr Met Leu His Arg Ala Ser Leu Phe Asp  
305 310 315 320

His His Glu Leu Ala Asp Tyr Leu Ile Ser Val Gly Ala Asp Ile Asn  
325 330 335

Lys Ile Asp Ser Glu Gly Arg Ser Pro Leu Ile Leu Ala Thr Ala Ser  
340 345 350

Ala Ser Trp Asn Ile Val Asn Leu Leu Leu Ser Lys Gly Ala Gln Val  
355 360 365

Asp Ile Lys Asp Asn Phe Gly Arg Asn Phe Leu His Leu Thr Val Gln  
370 375 380

Gln Pro Tyr Gly Leu Lys Asn Leu Arg Pro Glu Phe Met Gln Met Gln  
385 390 395 400

# ES 2 412 955 A1

Gln Ile Lys Glu Leu Val Met Asp Glu Asp Asn Asp Gly Cys Thr Pro  
405 410 415

Leu His Tyr Ala Cys Arg Gln Gly Gly Pro Gly Ser Val Asn Asn Leu  
420 425 430

Leu Gly Phe Asn Val Ser Ile His Ser Lys Ser Lys Asp Lys Lys Ser  
435 440 445

Pro Leu His Phe Ala Ala Ser Tyr Gly Arg Ile Asn Thr Cys Gln Arg  
450 455 460

Leu Leu Gln Asp Ile Ser Asp Thr Arg Leu Leu Asn Glu Gly Asp Leu  
465 470 475 480

His Gly Met Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Lys Asn Gly His Asp Lys  
485 490 495

Val Val Gln Leu Leu Leu Lys Lys Gly Ala Leu Phe Leu Ser Asp His  
500 505 510

Asn Gly Trp Thr Ala Leu His His Ala Ser Met Gly Gly Tyr Thr Gln  
515 520 525

Thr Met Lys Val Ile Leu Asp Thr Asn Leu Lys Cys Thr Asp Arg Leu  
530 535 540

Asp Glu Asp Gly Asn Thr Ala Leu His Phe Ala Ala Arg Glu Gly His  
545 550 555 560

Ala Lys Ala Val Ala Leu Leu Leu Ser His Asn Ala Asp Ile Val Leu  
565 570 575

Asn Lys Gln Gln Ala Ser Phe Leu His Leu Ala Leu His Asn Lys Arg  
580 585 590

Lys Glu Val Val Leu Thr Ile Ile Arg Ser Lys Arg Trp Asp Glu Cys  
595 600 605

Leu Lys Ile Phe Ser His Asn Ser Pro Gly Asn Lys Cys Pro Ile Thr  
610 615 620

Glu Met Ile Glu Tyr Leu Pro Glu Cys Met Lys Val Leu Leu Asp Phe  
625 630 635 640

# ES 2 412 955 A1

Cys Met Leu His Ser Thr Glu Asp Lys Ser Cys Arg Asp Tyr Tyr Ile  
645 650 655

Glu Tyr Asn Phe Lys Tyr Leu Gln Cys Pro Leu Glu Phe Thr Lys Lys  
660 665 670

Thr Pro Thr Gln Asp Val Ile Tyr Glu Pro Leu Thr Ala Leu Asn Ala  
675 680 685

Met Val Gln Asn Asn Arg Ile Glu Leu Leu Asn His Pro Val Cys Lys  
690 695 700

Glu Tyr Leu Leu Met Lys Trp Leu Ala Tyr Gly Phe Arg Ala His Met  
705 710 715 720

Met Asn Leu Gly Ser Tyr Cys Leu Gly Leu Ile Pro Met Thr Ile Leu  
725 730 735

Val Val Asn Ile Lys Pro Gly Met Ala Phe Asn Ser Thr Gly Ile Ile  
740 745 750

Asn Glu Thr Ser Asp His Ser Glu Ile Leu Asp Thr Thr Asn Ser Tyr  
755 760 765

Leu Ile Lys Thr Cys Met Ile Leu Val Phe Leu Ser Ser Ile Phe Gly  
770 775 780

Tyr Cys Lys Glu Ala Gly Gln Ile Phe Gln Gln Lys Arg Asn Tyr Phe  
785 790 795 800

Met Asp Ile Ser Asn Val Leu Glu Trp Ile Ile Tyr Thr Thr Gly Ile  
805 810 815

Ile Phe Val Leu Pro Leu Phe Val Glu Ile Pro Ala His Leu Gln Trp  
820 825 830

Gln Cys Gly Ala Ile Ala Val Tyr Phe Tyr Trp Met Asn Phe Leu Leu  
835 840 845

Tyr Leu Gln Arg Phe Glu Asn Cys Gly Ile Phe Ile Val Met Leu Glu  
850 855 860

Val Ile Leu Lys Thr Leu Leu Arg Ser Thr Val Val Phe Ile Phe Leu  
865 870 875 880

# ES 2 412 955 A1

Leu Leu Ala Phe Gly Leu Ser Phe Tyr Ile Leu Leu Asn Leu Gln Asp  
885 890 895

Pro Phe Ser Ser Pro Leu Leu Ser Ile Ile Gln Thr Phe Ser Met Met  
900 905 910

Leu Gly Asp Ile Asn Tyr Arg Glu Ser Phe Leu Glu Pro Tyr Leu Arg  
915 920 925

Asn Glu Leu Ala His Pro Val Leu Ser Phe Ala Gln Leu Val Ser Phe  
930 935 940

Thr Ile Phe Val Pro Ile Val Leu Met Asn Leu Leu Ile Gly Leu Ala  
945 950 955 960

Val Gly Asp Ile Ala Glu Val Gln Lys His Ala Ser Leu Lys Arg Ile  
965 970 975

Ala Met Gln Val Glu Leu His Thr Ser Leu Glu Lys Lys Leu Pro Leu  
980 985 990

Trp Phe Leu Arg Lys Val Asp Gln Lys Ser Thr Ile Val Tyr Pro Asn  
995 1000 1005

Lys Pro Arg Ser Gly Gly Met Leu Phe His Ile Phe Cys Phe Leu Phe  
1010 1015 1020

Cys Thr Gly Glu Ile Arg Gln Glu Ile Pro Asn Ala Asp Lys Ser Leu  
1025 1030 1035 1040

Glu Met Glu Ile Leu Lys Gln Lys Tyr Arg Leu Lys Asp Leu Thr Phe  
1045 1050 1055

Leu Leu Glu Lys Gln His Glu Leu Ile Lys Leu Ile Ile Gln Lys Met  
1060 1065 1070

Glu Ile Ile Ser Glu Thr Glu Asp Asp Asp Ser His Cys Ser Phe Gln  
1075 1080 1085

Asp Arg Phe Lys Lys Glu Gln Met Glu Gln Arg Asn Ser Arg Trp Asn  
1090 1095 1100

Thr Val Leu Arg Ala Val Lys Ala Lys Thr His His Leu Glu Pro  
1105 1110 1115

# ES 2 412 955 A1

<210> 2  
 <211> 5190  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<400> 2  
 ccagaagttc tccagggcct cgcagagcgc actttttcgc tgcctgtgag ctgcagcgcg 60  
 ggagagctcg ggctcgcgcg gaccccagcg cctggcaggc tgacagcgcct ctctcgcccc 120  
 aggtgcccgc gcgcgtggtg agcagctgca ccaggtggcg tccggggtgg ggtcaatgaa 180  
 gcgcagcctg aggaagatgt ggcgcacctg agaaaagaag gagccccagg gcgttgtcta 240  
 tgaggatgtg ccggacgaca cggaggatct caaggaatcg cttaagggtg tttttgaagg 300  
 aagtgcataa ggattacaaa actttaataa gcaaaaagaa ttaaaaagat gtgacgatat 360  
 ggacaccttc ttcttgcatc atgctgcagc agaaggccaa attgagctaa tggagaagat 420  
 caccagagat tcctcttttg aagtgtctga tgaaatggat gattatggaa ataccctctc 480  
 gcattgtgct gtagaaaaaa accaaattga aagcgttaag tttcttctca gcagaggagc 540  
 aaacccaaat ctccgaaact tcaacatgat ggctcctctc cacatagctg tgcagggcat 600  
 gaataatgag gtgatgaagg tcttgcttga gcatagaact attgatgtta atttggaagg 660  
 agaaaatgga aacacagctg tgatcattgc gtgcaccaca aataatagcg aagcattgca 720  
 gattttgctt aaaaaaggag ctaagccatg taaatcaaat aaatggggat gtttccctat 780  
 tcaccaagct gcattttcag gttccaaaga atgcatggaa ataatactaa ggtttggtga 840  
 agagcatggg tacagtagac agttgcacat taactttatg aataatggga aagccacccc 900  
 tctccacctg gctgtgcaaa atggtgactt ggaaatgatc aaaatgtgcc tggacaatgg 960  
 tgcacaaata gaccagtgag agaaggggaag gtgcacagcc attcattttg ctgccaccca 1020  
 gggagccact gagattgtta aactgatgat atcgctctat tctggtagcg tggatattgt 1080  
 taacacaacc gatggatgtc atgagaccat gcttcacaga gcttcattgt ttgatcacca 1140  
 tgagctagca gactatttaa tttcagtggg agcagatatt aataagatcg attctgaagg 1200  
 acgctctcca cttatattag caactgcttc tgcactcttg aatattgtaa atttgctact 1260  
 ctctaaagggt gcccaagtag acataaaaga taattttgga cgtaattttc tgcatttaac 1320  
 tgtacagcaa ctttatggat taaaaaatct ggcacctgaa tttatgcaga tgcaacagat 1380  
 caaagagctg gtaatggatg aagacaacga tgggtgtact cctctacatt atgcatgtag 1440  
 acaggggggc cctgggtctg taaataacct acttggtttt aatgtgtcca ttcattccaa 1500  
 aagcaaagat aagaaatcac ctctgcattt tgcagccagt tatgggcgta tcaataacctg 1560



## ES 2 412 955 A1

tcagaggctc ctacaagaca taagtgatac gaggcttctg aatgaagggtg accttcatgg	1620
aatgactcct ctccatctgg cagcaaagaa tggacatgat aaagtagttc agcttcttct	1680
gaaaaaaggt gcattgtttc tcagtgacca caatggctgg acagctttgc atcatgcgtc	1740
catgggcggg tacactcaga ccatgaagggt cattcttgat actaatttga agtgcacaga	1800
tcgcctggat gaagacggga aactgcact tcactttgct gcaagggaag gccacgccaa	1860
agccgttgcg cttcttctga gccacaatgc tgacatagtc ctgaacaagc agcaggcctc	1920
ctttttgcac cttgcacttc acaataagag gaaggagggtt gttcttacga tcatcaggag	1980
caaaagatgg gatgaatgtc ttaagatttt cagtcataat tctccaggca ataaatgtcc	2040
aattacagaa atgatagaat acctccctga atgcatgaag gtacttttag atttctgcat	2100
gttgcatctc acagaagaca agtcctgccg agactattat atcgagtata atttcaaata	2160
tcttcaatgt ccattagaat tcaccaaaaa aacacctaca caggatgtta tatatgaacc	2220
gcttacagcc ctcaacgcaa tgggtacaaa taaccgcata gagcttctca atcatcctgt	2280
gtgtaaagaa tatttactca tgaaatgggt ggcttatgga tttagagctc atatgatgaa	2340
tttaggatct tactgtcttg gtctcatacc tatgaccatt ctcgttgtca atataaaacc	2400
aggaatggct ttcaactcaa ctggcatcat caatgaaact agtgatcatt cagaaatact	2460
agataccacg aattcatatc taataaaaaac ttgtatgatt ttagtgtttt tatcaagtat	2520
atttgggtat tgcaaagaag cggggcaaat tttccaacag aaaaggaatt attttatgga	2580
tataagcaat gttcttgaat ggattatcta cagcaggggc atcatTTTTg tgctgccctt	2640
gtttgttgaa ataccagctc atctgcagtg gcaatgtgga gcaattgctg tttacttcta	2700
ttggatgaat ttcttattgt atcttcaaag atttgaaaat tgtggaattt ttattgttat	2760
gttgagggta attttgaaaa ctttggtgag gtctacagtt gtatttatct tccttcttct	2820
ggcttttgga ctacgctttt acatcctcct gaatttacag gatcccttca gctctccatt	2880
gctttctata atccagacct tcagcatgat gctaggagat atcaattatc gagagtcctt	2940
cctagaacca tatctgagaa atgaattggc acatccagtt ctgtcctttg cacaacttgt	3000
ttccttcaca atatttgtcc caattgtcct catgaattta ctatttggtt tggcagttgg	3060
cgacattgct gaggtccaga aacatgcata attgaagagg atagctatgc aggtggaact	3120
tcataaccagc ttagagaaga agctgccact ttggtttcta cgcaaagtgg atcagaaatc	3180
caccatcgtg tatcccaaca aaccagatc tgggtgggatg ttattccata tattctgttt	3240
tttattttgc actggggaaa taagacaaga aataccaaat gctgataaat ctttagaaat	3300

# ES 2 412 955 A1

ggaaatatta aagcagaaat accggctgaa ggatcttact tttctcctgg aaaaacagca 3360  
 tgagctcatt aaactgatca ttcagaagat ggagatcatc tctgagacag aggatgatga 3420  
 tagccattgt tcttttcaag acaggtttaa gaaagagcag atggaacaaa ggaatagcag 3480  
 atggaatact gtgttgagag cagtcaaggc aaaaacacac catcttgagc cttagctcct 3540  
 cagaccttca gtgaggcttc taatgggggg tgcatgactt gctggttcta actttcaatt 3600  
 taaaaagagt gaggaagaag cagaatgatt ctttttgctg cgtgtgaaat catggttcct 3660  
 gcatgctgta taaaagtaaa ccatctttta tctctattc atattttcta ccaatcacta 3720  
 tgtattgggg atatctttgc agatatgttc aaattggact ggactttgat gagatataat 3780  
 ctcatatttt gaatgggtag aaaatgaatt tgctagaaca cacattttta atgaaaagaa 3840  
 gtaataaatg taactattaa gctaaaatgc aaatgtcagt actgaattcc tgcttggttaa 3900  
 ttacataata tgtgatgctc tagaaaatag tcacaagtat taataatgcc ttagatgata 3960  
 gtcttaataa ttaggttgag gtctacctaa cctaagctgc ttcttggaat gcttcatggt 4020  
 gaaagaacct atgggtggca ccatgtggac ttttctgtcc ctactgtgat gaatagcccc 4080  
 acccttcttg ctgtcccaa cacacctgat gtcactttga gccatatagt tgaagtacaa 4140  
 attaataggc cttatgatat gcacgaattt tactatagat aatatatgtt gtttctgggt 4200  
 ttgtttgcca atgagcataa taaatgtaaa acctatatag tatccctgtg attattgtat 4260  
 gagcctttgt ttgagatttg aaaacaacat ggctccatca catattccct ttttctttt 4320  
 gatgtctact caaatcatga attaatcaca tacctcatca ttaatctttt caaggtcctt 4380  
 ctattgtttt gtctgatttt ctccatcatc ctgattagca tgtttattcc ctactaccc 4440  
 ccaggagata ttcactgtaa tgaatatgtc tttggctatg tatgtgtcct tgtgttatgt 4500  
 tgtacagtgt tgttttgagt ctgttattat ttacacagat gttattatgc tatagcttct 4560  
 atttctgttt ttgcttctta tttctcttat aattctcact tatttctat ttttctact 4620  
 ctttctatt tgttactcct ttttactgga catgatgttt acaagataca actgtgttac 4680  
 tgtattccat ctagtacggg gcctttggtg tggcttacta tttcattgtg tgcaccacc 4740  
 caccaccac actggacttt tctagagatg gacagcttgg ttacctccac ctctctgcac 4800  
 tcattctcaa acatactgat gttcatacaa accagcagag tgctgaggga cgatatgtac 4860  
 tattacaaaa ccagacactt ttacattcat ggtccaacag atcacatggc ctagaggcaa 4920  
 tgttgcatat acctaatct ttgatatgaa taatatcttt gttctttata tttcttaaaa 4980  
 cagaaagggg ggaatatcac tatacagaag caatatccaa agatctcctg atcataaaga 5040  
 caaggggtct tttcagtctt ccctctctc aaacctgtg tagcattgca caatatagat 5100

## ES 2 412 955 A1

ctcagtcaac attcactgag tgccaagaat gtgagaaaca ctgtaccatg cctgtcatgc	5160
gaaatattta aataaacaga ttgtcttaca	5190



OFICINA ESPAÑOLA  
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201131503

②② Fecha de presentación de la solicitud: 16.09.2011

③② Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **A61K31/352** (2006.01)  
**A61P29/00** (2006.01)

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	US 20090264480 A1 (PERNER et al.) 22.10.2009, resumen; párrafos 2-3,5,40,52-54,116-118,121-122,125.	1-9,13-15
Y	STRENG T. et al. "Distribution and function of the hydrogen sulfide-Sensitive TRPA1 ion channel in rat urinary bladder." European Urology (2008) vol. 53, páginas 391-400. Página 397.	1-9,13-15
X	GRATZKE C., et al. "Transient receptor potential a1 (TRPA1) activity in the human urethra-evidence for a functional role for TRPA1 in the outflow region." European Urology (2009) vol. 55, páginas 696-704. Introducción, discusión y conclusión.	1-7,15
A	COLSOUL B, NILIUS B. y VENNEKENS R. "On the putative role of transient receptor potential cation channels in asthma." Clinical and Experimental Allergy (2009) vol. 39, páginas 1456-1466. Página 1460.	1-15
A	CACERES A. I., et al. "A sensory neuronal ion channel essential for airway inflammation and hyperreactivity in asthma." Proceedings of the National academy of Sciences (2009) vol. 106, páginas 9099-9104. Todo el documento.	1-15

#### Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

#### El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe  
21.12.2012

Examinador  
M. J. García Bueno

Página  
1/5

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

A61K, A61P

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 TXTE, TXTF, XPESP, NPL, MEDLINE, BIOSIS, GOOGLE

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 21.12.2012

**Declaración****Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)**

Reivindicaciones 1-15  
Reivindicaciones

SI  
NO

**Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)**

Reivindicaciones 10-12  
Reivindicaciones 1-9, 13-15

SI  
NO

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

**Base de la Opinión.-**

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

**1. Documentos considerados.-**

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

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	US 20090264480 A1 (PERNER et al.)	22.10.2009
D02	STRENG T. et al. "Distribution and function of the hydrogen sulfide-Sensitive TRPA1 ion channel in rat urinary bladder." <i>European Urology</i> (2008) vol. 53, páginas 391-400. Página 397.	2008
D03	GRATZKE C., et al. "Transient receptor potential a1 (TRPA1) activity in the human urethra-evidence for a functional role for TRPA1 in the outflow region." <i>European Urology</i> (2009) vol. 55, páginas 696-704. Introducción, discusión y conclusión.	2009
D04	COLSOUL B, NILIUS B. y VENNEKENS R. "On the putative role of transient receptor potential cation channels in asthma." <i>Clinical and Experimental Allergy</i> (2009) vol. 39, páginas 1456-1466. Página 1460.	2009
D05	CACERES A. I., et al. "A sensory neuronal ion channel essential for airway inflammation and hyperreactivity in asthma." <i>Proceedings of the National academy of Sciences</i> (2009) vol. 106, páginas 9099-9104. Todo el documento.	2009

**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**

La presente solicitud de invención consiste en uso de un inhibidor de TRPA1 en la preparación de un medicamento para el tratamiento, prevención de enfermedades o disfunciones producidas por infecciones bacterianas o por exposición a endotoxinas bacterianas (reivindicaciones 1-14), y en dicho inhibidor para el uso anteriormente reivindicado (reivindicación 15).

El documento D01 consiste en unos compuestos antagonistas de TRPA1.

El documento D02 consiste en un estudio sobre la distribución de los TRPA1 en la vejiga urinaria de las ratas.

El documento D03 consiste en un estudio sobre la distribución de TRPA1 en la uretra humana y el efecto de los agonistas de TRPA1 en las preparaciones uretrales aisladas.

El documento D04 consiste en un estudio sobre el papel de los miembros de la familia de canales de cationes TRP en el desarrollo del asma. El documento D04 divulga que la inflamación de las vías aéreas puede inducirse mediante la administración intranasal de lipopolisacáridos de *Escherichia coli*, activándose TRPV1 (ver página 1460).

El documento D05 consiste en un estudio del papel de TRPA1 en el asma y la inhibición de dicho receptor con el antagonista HC-030031 (ver todo el documento).

**1.- NOVEDAD (Art. 6.1 Ley 11/1986).**

Las reivindicaciones 1-15 son nuevas en el sentido del artículo 6.1 Ley 11/1986.

**2.- ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 8.1 Ley 11/1986).****2.1.- Reivindicaciones 1-9 y 13-15.**

El documento D01 se considera el más próximo del estado de la técnica, y divulga el uso de inhibidores de TRPA1 en la preparación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades que producen dolor, como la cistitis, síndrome del intestino irritable, asma y EPOC.

El documento D01 también divulga el uso de dichos inhibidores de TRPA1 administrado en combinación con un agente terapéutico, como un analgésico o un fármaco antiinflamatorio no esteroide (ver resumen y párrafos 2-3, 5, 40, 52-54, 116-118, 121-122 y 125).

En el documento D01 no se divulga que las enfermedades en cuyo tratamiento se utilizan inhibidores de TRPA1 sean producidas por infecciones bacterianas o por exposición a endotoxinas bacteriana. Sin embargo, en el documento D02 se divulga que el sulfuro de hidrógeno es un activador de TRPA1 y está involucrado en enfermedades inflamatorias de la vejiga, como la cistitis producida por *Escherichia coli*, bacteria que produce H<sub>2</sub>S (ver página 397).

Se considera que un experto en la materia combinaría los documentos D01 y D02 para obtener las características de las reivindicaciones 1-9 y 13-15 y tener una expectativa razonable de éxito.

Por lo tanto, las reivindicaciones 1-9 y 13-15 no implican actividad inventiva en el sentido del artículo 8.1 Ley 11/1986.

El documento D03 divulga que el sulfuro de hidrógeno activa TRPA1 y es un modulador endógeno de la inflamación mediada por leucocitos, y bacterias como *Escherichia coli*, que están implicadas en el desarrollo de infecciones del tracto urinario, como la cistitis (ver introducción, discusión y conclusión).

A la vista de lo que se conoce del documento D03 no se considera que se requiera ningún esfuerzo inventivo para un experto en la materia utilizar un inhibidor de TRPA1 para la preparación de un medicamento para el tratamiento de cistitis producidas por *Escherichia coli*.

Por lo tanto se considera que las reivindicaciones 1-7 y 15 no implican actividad inventiva en el sentido del artículo 8.1 Ley 11/1986.

## 2.2.- Reivindicaciones 10-12.

Las reivindicaciones 10-12 se consideran que implican actividad inventiva en el sentido del artículo 8.1 Ley 11/1986.