



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 358 538**

51 Int. Cl.:  
**A61K 31/713** (2006.01)  
**C12N 15/11** (2006.01)  
**A61P 17/14** (2006.01)  
**A61P 27/02** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06794999 .0**  
96 Fecha de presentación : **20.10.2006**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1937281**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.07.2008**

54 Título: **Modulación de niveles de expresión de TRPV.**

30 Prioridad: **20.10.2005 GB 0521351**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**11.05.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**11.05.2011**

73 Titular/es: **SYLENTIS, S.A.U.**  
**c/ José Abascal, 2**  
**28003 Madrid, ES**

72 Inventor/es: **Acosta Boj, María del Carmen;**  
**Gallar Martínez, Juana;**  
**Sesto Yagüe, Ángela;**  
**Jiménez Gómez, María Concepción;**  
**Belmonte Martínez, Carlos y**  
**Jiménez Antón, Ana Isabel**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 358 538 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Modulación de niveles de expresión de TRPV

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere a composiciones para el tratamiento y/o la prevención de estados relacionados con altos niveles de expresión y/o actividad del potencial receptor transitorio de vaniloide-1 (TRPV1). Van a mitigarse, entre otros, estados oculares tales como molestia y sensibilidad alterada de la córnea tras cirugía refractiva, uso de lentes de contacto, ojos secos y retinopatía diabética.

10 También se proporcionan procedimientos y composiciones para el tratamiento y/o la prevención de estados anómalos de la piel y el folículo piloso mediados por altos niveles de expresión y/o actividad de TRPV1, tales como alopecia. La invención proporciona el uso de la tecnología de ARNi para regular por disminución la expresión de TRPV1.

**Antecedentes de la invención**

15 La interferencia de ARN se refiere al procedimiento de silenciamiento génico postranscripcional específico de secuencia mediado por ARN pequeños de interferencia (ARNsi). Tras el descubrimiento del fenómeno en plantas en los primeros años 1990, Andy Fire y Craig Mello demostraron que el ARN bicatenario (ARNds) inhibía de manera específica y selectiva la expresión génica de manera extremadamente eficaz en *Caenorhabditis elegans* (Fire *et al.*, 1998, Potent and specific genetic interference by double stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. Nature, 391:806). La secuencia de la primera cadena (ARN sentido) coincidía con la de la región correspondiente del ARN mensajero (ARNm) diana. La segunda cadena (ARN antisentido) era complementaria al ARNm. El ARnds resultante resultó ser  
20 varios ordenes de magnitud más eficaz que las correspondientes moléculas de ARN monocatenarias (en particular, ARN antisentido).

25 El procedimiento de ARNi comienza cuando la enzima, DICER, encuentra ARnds y lo corta en trozos denominados ARN pequeños de interferencia (ARNsi). Esta proteína pertenece a la familia de nucleasas RNasa III. Un complejo de proteínas reúne estos residuos de ARN y usa su código como guía para buscar y destruir cualquier ARN en la célula con una secuencia de apareamiento, tal como ARNm diana (véase Boshier & Labouesse, 2000, RNA interference: genetic wand and genetic watchdog. Nat Cell Biol, 2000, 2 (2):E31, y Akashi *et al.*, 2001, Suppression of gene expression by RNA interference in cultured plant cells. Antisense Nucleic Acid Drug Dev, 11(6):359).

30 En intentos de utilizar ARNi para el silenciamiento génico se reconoció que las células de mamífero han desarrollado diversos mecanismos protectores contra infecciones virales que podrían dificultar el uso de este enfoque. De hecho, la presencia de niveles extremadamente bajos de ARnds viral provoca una respuesta de interferón, dando como resultado una supresión de la traducción no específica global, lo que a su vez provoca apoptosis (Williams, 1997, Role of the double-stranded RNA-activated protein kinase (PKR) in cell regulation. Biochem Soc Trans, 25(2):509; Gil & Esteban, 2000, Induction of apoptosis by the dsRNA-dependent protein kinase (PKR): mechanism of action. Apoptosis, 5(2): 107-14).

35 En 2000 se notificó que ARnds inhibía específicamente 3 genes en el ovocito de ratón y embrión temprano. La detención de la traducción, y por tanto una respuesta de PKR, no se observó cuando los embriones continuaron desarrollándose (Wianny & Zernicka-Goetz, 2000, Specific interference with gene function by double-stranded RNA in early mouse development. Nat Cell Biol, 2(2):70). La investigación en Ribopharma AG (Kulmbach, Alemania) demostró que la funcionalidad de ARNi en células de mamífero, usando ARnds pequeño (20-24 pares de bases)  
40 interrumpía genes en células humanas sin iniciar la respuesta de fase aguda. Estos resultados se confirmaron por experimentos similares llevados a cabo por otros grupos de investigación. (Elbashir *et al.*, 2001, RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. Genes Dev, 15(2): 188; Caplen *et al.*, 2001, Specific inhibition of gene expression by small double stranded RNAs in invertebrate and vertebrate systems. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 98: 9742). Sometido a prueba en una variedad de líneas de células de ratón y humanas de cáncer y normales, se determinó que el ARN de horquilla pequeña (ARNsh) puede silenciar genes de manera tan eficaz como sus homólogos de ARnsi (Paddison *et al.*, 2002, Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells. Genes Dev, 16(8):948). Recientemente, se demostró que otro grupo de ARN pequeños (21-25 pares de bases) mediaban la regulación por disminución de la expresión génica. Estos ARN, ARN pequeños regulados temporalmente (ARNst), regulan la sincronización de la expresión génica durante el desarrollo en  
45 *Caenorhabditis elegans* (para revisión véase Banerjee & Slack, Control of developmental timing by small temporal RNAs: a paradigm for RNA-mediated regulation of gene expression. Bioessays, 2002, 24(2): 119-29 y Grosshans & Slack, 2002, Micro-RNAs: small is plentiful. J Cell Biol, 156(1):17).

55 Los científicos han usado ARNi en varios sistema, incluyendo *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila*, trypanosomas y otros invertebrados. Varios grupos han presentado recientemente la supresión específica de la biosíntesis de proteínas en diferentes líneas de células de mamífero (específicamente en células HeLa) demostrando que ARNi es un procedimiento que puede aplicarse ampliamente para el silenciamiento génico *in vitro*. Basándose en estos

resultados, ARNi se ha convertido rápidamente en una herramienta bien reconocida para validar (identificar y asignar) la función génica. El ARNi que emplea oligonucleótidos de ARNs pequeños proporcionará un entendimiento de la función de genes que están secuenciados sólo parcialmente.

5 El potencial receptor transitorio de vaniloide-1 (TRPV1), también denominado receptor de vaniloide 1 (VR-1), es un canal catiónico dependiente de ligando sensible a capsaicina, que se descubrió por primera vez en 1997 (Caterina *et al.* The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*. 23 de octubre de 1997;389(6653):816-24). TRPV1 se expresa principalmente en neuronas sensoriales y sirve como detector molecular de calor, capsaicina, protones y endovaniloides (Caterina MJ & Julius D. The vanilloid receptor: a molecular gateway to the pain pathway. *Annu Rev Neurosci.*, 2001;24:487-517; Montell *et al.* Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells. *Genes Dev.*, 2002, 16(8): 948-58.; Baumann TK & Martenson ME. Extracellular protons both increase the activity and reduce the conductance of capsaicin-gated channels. *J Neurosci.* 2000; 20:RC80).

15 Cuando TRPV1 se activa por agonistas tales como capsaicina y otros factores tales como calor, acidosis, productos de lipoxigenasa o anandamida, el calcio entra en la célula y se inician señales de dolor. La activación del canal induce la liberación de neuropéptidos desde terminales nerviosas sensoriales centrales y periféricas, dando como resultado la sensación de dolor, inflamación neurogénica, y a veces, contracción del músculo liso y tos. Las pruebas recientes sugieren un papel de TRPV1 en el dolor, tos, asma e incontinencia urinaria (Jia *et al.*, TRPV1 receptor: a target for the treatment of pain, cough, airway disease and urinary incontinence. *Drug News Perspect.* Abril 2005;18(3): 165-71).

20 Debido al hecho de que tanto la sensibilidad como la densidad de expresión de TRPV1 se potencian durante estados inflamatorios (Di Marzo *et al.*, Endovanilloid signaling in pain. *Curr Opin Neurobiol.* Agosto 2002;12(4): 372-9), la regulación por disminución de la expresión y/o actividad de TRPV1 es una estrategia terapéutica prometedora para fármacos analgésicos novedosos. A decir verdad, la administración intraperitoneal de bloqueadores de TRPV1 selectivos en ratones demostró atenuar la nocicepción química y térmica y la hiperalgesia (Garcia-Martinez *et al.*, Attenuation of thermal nociception and hyperalgesia by VR1 blockers. *Proc Natl Acad Sci USA.* 19 de febrero 2002;99(4):2374-9).

30 La función del canal de TRPV1 está regulada por incremento por varios mediadores endógenos presentes en estados inflamatorios, que reducen el umbral para la activación del canal. Por tanto, se ha demostrado recientemente que el comportamiento relacionado con el dolor agudo provocado mediante la fuerza iónica elevada se suprime en ratones sin TRPV1 y se inhibe mediante yodoresiniferatoxina, un potente antagonista de TRPV1 (Ahern *et al.*, Extracellular cations sensitize and gate capsaicin receptor TRPV1 modulating pain signaling. *J Neurosci.* 25 de mayo de 2005 ;25(21):5109-16). Además, la prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) y prostaglandina I<sub>2</sub> (PGI<sub>2</sub>) han demostrado aumentar o sensibilizar respuestas de TRPV1 a través de sus respectivos receptores EP<sub>1</sub> o IP (Moriyama *et al.*, Sensitization of TRPV1 by EP1 and IP reveals peripheral nociceptive mechanism of prostaglandins. *Mol Pain.* 17 de enero de 2005;1(1):3), lo que sugiere por primera vez que la sensibilización de la actividad de TRPV1 a través de la activación de EP<sub>1</sub> o IP podría ser un mecanismo importante subyacente en las acciones nociceptivas periféricas de PGE<sub>2</sub> o PGI<sub>2</sub>. El documento WO 2004/042046 muestra que el ARNs dirigido frente a VR1 puede usarse en el tratamiento de dolor crónico, trastornos de sensibilidad unidos al receptor VR1 e inflamación, tumores, incontinencia urinaria y prurito asociados a VR.

40 Los nociceptores polimodales son el tipo de nociceptores más abundante hallados en la córnea. Existen pruebas farmacológicas de que estas fibras de receptor expresan el receptor TRPV1 porque responden a capsaicina, calor y ácido. Además, altas dosis de capsaicina inactivan la activación de nociceptores polimodales de la córnea frente al calor y ácido mientras que la respuesta mecánica sigue estando no afectada. Esto sugiere que los receptores TRPV1 presentes en las terminales nerviosas polimodales de la córnea se inactivaron selectivamente. Por tanto, es probable que una parte importante de la respuesta nociceptiva aguda a la lesión de la córnea y las sensaciones de dolor sostenido que acompañan a los procesos inflamatorios e irritativos en este tejido están mediados por la activación de TRPV1.

50 Además, pruebas recientes demuestran que tanto la insulina como IGF-I potencian las corrientes de membrana mediadas por TRPV1 en sistemas de expresión heterólogos y neuronas de ganglios de la raíz dorsal cultivadas (Van Buren *et al.*, Sensitization and translocation of TRPV1 by insulin and IGF-I. *Mol Pain.* 27 de abril de 2005;1(1):17). La potenciación de corrientes de membrana resulta de tanto un aumento de la sensibilidad del receptor como la traslocación de TRPV1 desde el citosol hasta la membrana plasmática. Se ha encontrado un aumento de IGF-1 en el suero (Merimee *et al.*, Insulin-like growth factors. *Studies in diabetics with and without retinopathy.* *N. Engl. J. Med.*, 1983; 309:527-530; Grant *et al.*, Insulin-like growth factors in vitreous. *Studies in control and diabetic subjects with neovascularization.* *Diabetes*, 1986; 35: 416-420) y el cuerpo vítreo y fluido intraocular (Grant *et al.*, 1986; Inokuchi *et al.*, Vitreous levels of insulin-like growth factor-I in patients with proliferative diabetic retinopathy. *Curr. Eye Res.*, 2001; 23:368-371) de pacientes con retinopatía diabética. Además, los niveles de IGF-I vítreos están correlacionados con la presencia y gravedad de la neovascularización de la retina diabética asociada a la isquemia (Meyer-Schwickerath *et al.*, Vitreous levels of the insulinlike growth factors I and II, and the insulin-like growth factor

binding proteins 2 and 3, increase in neovascular eye disease. Studies in nondiabetic and diabetic subjects. J Clin Invest., 1993;92(6):2620-5). Sin embargo, la fuente del aumento de IGF-1 ocular en retinopatía es controvertida y se desconoce la contribución relativa de cualquiera de IGF-1 endógeno o IGF-1 sérico (Ruberte *et al.*, Increased ocular levels of IGF-1 in transgenic mice lead to diabetes-like eye disease. J Clin Invest. Abril de 2004;113 (8):1149-57). La modulación de los niveles de TRPV1 podría ayudar en el control de la retinopatía diabética mediada por IGF-I.

Aunque descrito originariamente en neuronas sensoriales, se ha detectado ahora TRPV1 en varias poblaciones de células de piel humanas y compartimentos epiteliales del folículo piloso (HF) humano, principalmente la vaina radicular externa (ORS) y matriz capilar (Bodo *et al.*, A hot new twist to hair biology: involvement of vanilloid receptor-1 (VR1/TRPV1) signaling in human hair growth control. Am J Pathol. Abril de 2005;166(4):985-98). La estimulación de TRPV1 en cultivo de órganos y queratinocitos de ORS humanos cultivados inhibe la proliferación, induce la apoptosis, eleva la concentración de calcio intracelular, regula por incremento inhibidores del crecimiento capilar endógenos conocidos y regula por disminución promotores del crecimiento capilar conocidos, confirmando de ese modo el TRPV1 como participante novedoso significativo en el control del crecimiento capilar humano (Bodo *et al.*, 2005).

Las pruebas mencionadas anteriormente apuntan a la inhibición de TRPV1 como tratamiento eficaz para estados oculares que median con un exceso de expresión y/o actividad de TRPV1, tales como molestia y sensibilidad alterada de la córnea tras cirugía refractiva, uso de lentes de contacto y ojos secos. La relación funcional entre TRPV1 y IGF-I destaca la importancia de la regulación por disminución de TRPV1 para el tratamiento de retinopatía diabética mediada por altos niveles de IGF-I. El papel desempeñado por TRPV1 en el crecimiento del folículo piloso humano y queratinocitos selecciona como diana a TRPV1 como buen candidato que va a inhibirse para el tratamiento de estados anómalos de la piel y el folículo piloso tales como alopecia.

### **Sumario de la invención**

En la presente invención se describe el uso de ANsi dirigido frente a TRPV1 en la preparación de un fármaco de acuerdo con la reivindicación 1. El uso se basa en la regulación por disminución de la expresión de una o más formas de corte y empalme del gen TRPV1. La inhibición (regulación por disminución) puede realizarse mediante el uso de restos de ácido nucleico bicatenario, denominados ANsi o AN pequeño de interferencia que se dirigen en la interferencia con la expresión de ARNm de o bien una o bien más formas de corte y empalme del gen TRPV1. Los ANsi son preferiblemente ARNsi, aunque también se incluyen ácidos nucleicos modificados o entidades similares químicamente sintetizadas dentro del alcance de la invención.

El receptor TRPV1, como otros canales y proteínas de membrana, se produce dentro de la célula y se transporta hacia la periferia mediante el transporte axónico centrífugo. No obstante, existe la posibilidad de que TRPV1 también se sintetice en las terminales nerviosas sensoriales, insertándose localmente en la membrana de la parte transductora de las terminales. Por tanto, sin querer unirse a ninguna teoría, se sugiere que el bloqueo de la síntesis local de TRPV1 a través de la administración tópica de ANsi dirigido a silenciar específicamente el gen encargado de la expresión de TRPV1 podría conducir a una inactivación parcial o completa de fibras nociceptoras polimodales de la córnea frente a estímulos químicos mediante estímulos exógenos o endógenos y a una reducción o eliminación de su actividad impulsiva asociada a lesión e inflamación.

En un primer aspecto de la presente invención se refiere al uso de ANsi en la preparación de un fármaco para su uso en un procedimiento de tratamiento de un estado anómalo ocular y/o de folículo piloso caracterizado por un aumento de la expresión y/o actividad de TRPV1 de acuerdo con la reivindicación 1.

Un segundo aspecto de la presente invención se refiere a un compuesto de ANsi que selecciona como diana a TRPV1 que comprende una secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de nucleótidos de SEC ID N°: 65.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un compuesto de ANsi que selecciona como diana a TRPV1 que comprende una secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de nucleótidos de SEC ID N°: 65.

El estado de acuerdo con la invención es un estado ocular anómalo, tales como sensibilidad alterada de la córnea tras cirugía refractiva, uso de lentes de contacto, ojos secos, retinopatía diabética y otras patologías oculares.

### **Descripción de los dibujos**

La figura 1 presenta números de registro de GenBank que corresponden a los cuatro transcritos de TRPV1 producidos mediante corte y empalme alternativo.

La figura 2 muestra fragmentos de ADN pequeños de la secuencia génica diana elegidos como secuencias diana preferidas del ANsi de la invención.

La figura 3 muestra moléculas de ANsi preferidas de la invención.

La figura 4. Efecto de la aplicación tópica de una gota de 10 µl de disolución de capsaicina 0,1 mM en el ojo

derecho y de 10 µl de solución salina isotónica estéril en el ojo izquierdo de cobayas. Se analizaron movimientos de rascado y lavado (A), lagrimeo (B) e hiperemia conjuntival (C).

La figura 5. Efecto atenuante de ON3 sobre la respuesta de comportamiento a capsaicina tópica 0,1 mM. Se analizaron movimientos de rascado y lavado (A), lagrimeo (B) e hiperemia conjuntival (C).

- 5 La figura 6. Reducción promedio del número de movimientos de rascado/lavado en todos los animales estudiados, presentados en valores absolutos (gráfica superior) y como porcentaje de la reducción en el lado tratado a partir del lado control, en los diversos días tras el tratamiento.  
La figura 7. Configuración de cámara de registro.

### **Descripción detallada de la invención**

- 10 En un primer aspecto, la invención se refiere al uso de ANsi en la preparación de un fármaco para su uso en un procedimiento de tratamiento de un estado anómalo ocular caracterizado por un aumento de la expresión y/o actividad de TRPV1 de acuerdo con la reivindicación 1. El uso puede comprender inhibir la expresión de TRPV1 en un paciente. El término inhibición se usa para indicar una reducción o regulación por disminución de la expresión o actividad. Preferiblemente, el estado ocular se selecciona del grupo que comprende molestia y sensibilidad alterada de la córnea tras cirugía refractiva, uso de lentes de contacto, ojos secos, retinopatía diabética y otras patologías oculares.

- Un gen se “selecciona como diana” por un ANsi de acuerdo con la presente invención cuando, por ejemplo, la molécula de ANsi reduce o inhibe selectivamente la expresión del gen. La frase “reduce o inhibe selectivamente” tal como se usa en el presente documento engloba ANsi que efectúan la expresión de un gen. Como alternativa, un ANsi selecciona como diana a un gen cuando el ANsi hibrida en condiciones rigurosas con el transcrito génico.

- 20 En una realización, ANsi de acuerdo con la invención es ARNsi.

- Se han identificado cuatro variantes de transcrito que corresponden a TRPV1. En la figura 1 se presentan números de registro de GenBank que corresponden a los cuatro transcritos de TRPV1 producidos mediante corte y empalme alternativo. Preferiblemente, el ANsi selecciona como diana a una forma de corte y empalme de TRPV1 seleccionada del grupo que tiene números de acceso de GenBank NM\_080704, NM\_018727, NM\_080706, NM\_080705.

- En la figura 2 se muestran secuencias de oligonucleótidos seleccionadas frente a las que se dirige ARNi de acuerdo con el primer aspecto de la invención. Las secuencias presentadas son las secuencias de ADN seleccionadas como diana por el ANsi. Por tanto, la invención hace uso de dúplex de AN con secuencias complementarias a las secuencias de ADN indicadas. Por tanto, de acuerdo con el primer aspecto de la invención, el ANsi selecciona como diana a una secuencia seleccionada de SEC ID N° 1 a SEC ID N° 81 o a una secuencia que comprende una secuencia seleccionada de SEC ID N° 1 a SEC ID N° 81. Así, el ANsi es complementario a una secuencia seleccionada de SEC ID N° 1 a SEC ID N° 81 o a una secuencia que comprende una secuencia seleccionada de SEC ID N° 1 a SEC ID N° 81.

- 35 Según la invención, puede usarse una pluralidad de especies de ANsi. En una realización, la pluralidad de especies de ANsi puede seleccionar como diana a la misma especie de ARNm, en otra realización, puede seleccionar como diana a diferentes especies.

- Las secuencias presentadas en la figura 2 no son limitativas. Según la invención, el ADN diana no necesita estar precedido necesariamente por AA o CA. Además, el ADN diana podría estar constituido por secuencias incluidas en la figura 2 flanqueadas por cualquier secuencia contigua.

- También describen los inventores un compuesto de ANsi que selecciona como diana a TRVP1 que comprende una secuencia de nucleótidos complementaria a una secuencia de nucleótidos seleccionada de SEC ID N° 1 a 44 o SEC ID N° 46 a 81 tal como se muestra en la figura 2. En una realización, la SEC preferida es SEC ID N° 65.

- 45 También describen los inventores un compuesto de ANsi que selecciona como diana a TRVP1 que comprende una secuencia de nucleótidos complementaria a una secuencia de nucleótidos seleccionada de SEC ID N° 1 a 44 o SEC ID N° 46 a 81 para su uso en el tratamiento de una enfermedad caracterizada por un aumento de la expresión y/o actividad de TRPV1, comprendiendo el ANsi una secuencia de nucleótidos complementaria a una secuencia de nucleótidos seleccionada de SEC ID N° 1 a 44 o SEC ID N° 46 a 81.

- También describen los inventores una composición farmacéutica que comprende una secuencia de nucleótidos complementaria a una secuencia de nucleótidos seleccionada de SEC ID N° 1 a 44 o SEC ID N° 46 a 81.

- 50 Por ejemplo, las moléculas de ANsi comprenden secuencias de nucleótidos seleccionadas del grupo de SEC ID N° 82 a 162. Por ejemplo, las moléculas de ANsi comprenden secuencias de nucleótidos seleccionadas del grupo de SEC ID N° 82 a 122 o 123 a 162.

Por ejemplo, las moléculas de ANsi comprenden nucleótidos de proyección.

5 También describen los inventores un procedimiento para inhibir la expresión y/o actividad de TRPV1 *ex vivo* en células o tejido que comprende tratar dichas células o tejido con el compuesto que comprende una secuencia de nucleótidos complementaria a una secuencia de nucleótidos seleccionada de SEC ID N° 1 a 44 o SEC ID N° 46 a 81 de modo que se inhibe la expresión de TRVP1.

10 También describen los inventores un procedimiento de tratamiento de una enfermedad caracterizada por un aumento de la expresión y/o actividad de TRPV1, que comprende administrar ANsi para inhibir la expresión del gen TRPV1 en un paciente, en el que el estado patológico se selecciona del grupo que comprende un estado ocular anómalo, tal como sensibilidad alterada de la córnea tras cirugía refractiva, uso de lentes de contacto, ojos secos, retinopatía diabética y otras patologías oculares, así como también un estado anómalo del folículo piloso tal como alopecia.

15 Los términos “tratar” o “tratamiento” tal como se usan en el presente documento describen la gestión y el cuidado de un paciente para los fines de combatir la enfermedad e incluye la administración del principio activo a individuos sintomáticos, por ejemplo para prevenir la aparición de los síntomas o complicaciones, es decir profilaxis.

15 - Diseño de ANsi.

20 Se elige un fragmento pequeño de la secuencia génica diana (por ejemplo, 19-40 nucleótidos de longitud) como secuencia diana del ANsi de la invención. En una realización, el ANsi es un ARNsi. En tales realizaciones, el fragmento pequeño de la secuencia génica diana es un fragmento del ARNm del gen diana. En realizaciones preferidas, los criterios para elegir un fragmento de secuencia del ARNm del gen diana que va a ser una molécula de ARNsi candidata incluyen 1) una secuencia del ARNm del gen diana que es al menos de 50-100 nucleótidos desde el extremo en 5' o 3' de la molécula de ARNm nativa, 2) una secuencia del ARNm del gen diana que tiene un contenido en G/C de entre el 30% y el 70%, lo más preferiblemente aproximadamente el 50%, 3) una secuencia del ARNm del gen diana que no contiene secuencias repetitivas (por ejemplo, AAA, CCC, GGG, TTT, AAAA, CCCC, GGGG, TTTT), 4) una secuencia del ARNm del gen diana que es accesible en el ARNm y 5) una secuencia del ARNm del gen diana que es única para el gen diana. El fragmento de secuencia del ARNm del gen diana puede cumplir uno o más de los criterios identificados anteriormente. En realizaciones en las que un fragmento del ARNm del gen diana cumple sin llegar a la totalidad de los criterios identificados anteriormente, la secuencia nativa puede alterarse de manera que el ARNsi está de acuerdo con más de los criterios de lo que lo hace el fragmento del ARNm del gen diana. En realizaciones preferidas, el ARNsi tiene un contenido en G/C inferior al 60% y/o carece de secuencia repetitiva.

35 En la práctica, el gen seleccionado se introduce como secuencia de nucleótidos en un programa de predicción que tiene en cuenta todas las variables descritas anteriormente para el diseño de oligonucleótidos óptimos. Este programa examina cualquier secuencia de nucleótidos de ARNm para determinar regiones susceptibles de ser seleccionadas como diana por el ARNsi. El resultado de este análisis es una puntuación de posibles oligonucleótidos de ARNsi. Las puntuaciones más altas se usan para diseñar oligonucleótidos de ARN bicatenario (normalmente 21 pb de longitud, aunque otras longitudes también son posibles) que se preparan normalmente mediante síntesis química.

40 Además del ANsi que es complementario a la región diana de ARNm, pueden usarse secuencias degeneradas de ANsi de acuerdo con la invención para seleccionar como diana a regiones homólogas. El documento WO2005/045037 describe el diseño de moléculas de ANsi para seleccionar como diana a tales secuencias homólogas, por ejemplo mediante la incorporación de pares de base no canónicas, por ejemplo apareamientos erróneos y/o pares de base del titubeo, que pueden proporcionar secuencias diana adicionales. En ejemplos en los que se identifican apareamientos erróneos pueden usarse pares de base no canónicas (por ejemplo, apareamientos erróneos y/o bases del titubeo) para generar moléculas de ANsi que seleccionan como diana a más de una secuencia génica. En un ejemplo no limitativo se usan pares de base, no canónicas, tales como pares de base UU y CC para generar moléculas de ANsi que pueden seleccionar como diana a secuencias para diferenciar dianas que comparten homología de secuencia.

45 En realizaciones preferidas, las moléculas de ANsi usadas de acuerdo con la invención seleccionan como diana a una secuencia seleccionada de SEC ID N<sup>os</sup>: 1-81 (figura 2).

50 Las moléculas de ANsi preferidas usadas de acuerdo con la invención son bicatenarias. En una realización, las moléculas de ANsi bicatenarias comprenden extremos romos. En otra realización, las moléculas de ANsi bicatenarias comprenden nucleótidos de proyección (por ejemplo, proyecciones de 1-5 nucleótidos, preferiblemente proyecciones de 2 nucleótidos). En una realización específica, los nucleótidos de proyección son proyecciones en 3'. En otra realización específica, los nucleótidos de proyección son proyecciones en 5'. Cualquier tipo de nucleótidos puede ser una parte de la proyección. En una realización, el nucleótido o los nucleótidos de proyección son ácidos ribonucleicos. En otra realización, el nucleótido o los nucleótidos de proyección son ácidos desoxirribonucleicos. En una realización preferida, el nucleótido o los nucleótidos de proyección son nucleótidos de timidina. En otra

realización, el nucleótido o los nucleótidos de proyección son nucleótidos modificados o no clásicos. El nucleótido o los nucleótidos de proyección pueden tener enlaces internucleotídicos no clásicos (por ejemplo, distinto del enlace fosfodiéster).

5 En realizaciones preferidas, las moléculas de ANsi usadas de acuerdo con la invención comprenden secuencias de nucleótidos seleccionadas de SEC ID N<sup>os</sup>: 82-162 (figura 3). En otra realización preferida, las composiciones de ARNds de la invención son cualquiera de SEC ID N<sup>os</sup>: 82-162. La invención también engloba el uso de ANsi que son de 40 nucleótidos o menos y comprenden una secuencia de nucleótidos de cualquiera de SEC ID N<sup>os</sup>: 82-162 así como también composiciones de ARNds que son de 40 nucleótidos o menos y comprenden una secuencia de nucleótidos de cualquiera de SEC ID N<sup>os</sup>: 82-162 hibridada con su complemento. En una realización, el ANsi es de 10 21-30 nucleótidos y comprende una cualquiera de SEC ID N<sup>os</sup>: 82-162.

- Síntesis de ANsi.

15 Pueden sintetizarse ANsi para su uso de acuerdo con la invención mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica. Preferiblemente se sintetizan químicamente ARN usando fosforamiditas de ribonucleósido protegidas apropiadamente y un sintetizador de ADN/ARN convencional. Adicionalmente, pueden obtenerse ARNsi a partir de proveedores de síntesis de oligos de ARN comerciales, incluyendo, pero sin limitarse a, Proligo (Hamburg, Alemania), Dharmacon Research (Lafayette, CO, EE.UU.), Glen Research (Sterling, VA, EE.UU.), ChemGenes (Ashland, MA, EE.UU.), y Cruachem (Glasgow, RU), Qiagen (Alemania), Ambion (EE.UU.) y Invitrogen (Escocia). Como alternativa, pueden expresarse moléculas de ANsi de la invención en células mediante la transfección de las células con vectores que contienen la secuencia de ANsi de complemento inversa bajo el control de un promotor. 20 Una vez expresado, el ANsi puede aislarse de la célula usando técnicas bien conocidas en la técnica.

En realizaciones en las que el ARNsi es un ARNds, una etapa de apareamiento es necesaria si se obtienen moléculas de ARN monocatenarias. En resumen, se combinan 30 µl de cada disolución 50 µM de oligo de ARN en acetato de potasio 100 mM, HEPES-KOH 30 mM pH 7,4, acetato de magnesio 2 mM. Entonces se incuba la disolución durante 1 minuto a 90°C, se centrifuga durante 15 segundos y se incuba durante 1 hora a 37°C.

25 En realizaciones en las que el ARNsi es un ARN de horquilla pequeña (ARNsh); las dos cadenas de la molécula de ARNsi pueden estar conectadas mediante una región de ligador (por ejemplo, un ligador nucleotídico o un ligador no nucleotídico).

- Modificación química de ANsi.

30 Los ANsi usados de acuerdo con la invención pueden contener uno o más nucleótidos modificados y/o enlaces no fosfodiéster. Las modificaciones químicas bien conocidas en la técnica pueden aumentar la estabilidad, disponibilidad y/o captación celular del ANsi. El experto será consciente de otros tipos de modificación química que pueden incorporarse en moléculas de ARN (véase las publicaciones internacionales WO03/070744 y WO2005/045037 para una revisión de tipos de modificaciones). En una realización, pueden usarse modificaciones para proporcionar resistencia mejorada a la degradación o captación mejorada. Ejemplos de tales modificaciones 35 incluyen enlaces internucleotídicos de fosforotioato, 2'-O-metilribonucleótidos (especialmente en la cadena sentido de un ARNsi bicatenario), 2'-desoxi-fluororribonucleótidos, 2'-desoxirribonucleótidos, nucleótidos de "base universal", 5-C-metilnucleótidos, incorporación desoxiabásica invertida (véase en general, el documento GB2406568).

40 En otra realización, pueden usarse modificaciones para potenciar la estabilidad del ARNsi o para aumentar la eficacia de selección como diana. Las modificaciones incluyen entrecruzamiento químico entre las dos cadenas complementarias de un ARNsi, modificación química de un extremo terminal en 3' o en 5' de una cadena de un ARNsi, modificaciones de azúcares, modificaciones de nucleobases y/o modificaciones de la estructura principal, ribonucleótidos 2'-fluoro-modificados y 2'-desoxirribonucleótidos (véase en general, la publicación internacional WO2004/029212).

45 En otra realización, pueden usarse modificaciones para aumentar o reducir la afinidad por los nucleótidos complementarios en el ARNm diana y/o en la cadena de ANsi complementaria (véase en general, la publicación internacional WO2005/044976). Por ejemplo, un nucleótido de pirimidina no modificada puede sustituirse por una 2-tio, 5-alquil, 5-metil o 5-propinilpirimidina. Adicionalmente, una purina no modificada puede sustituirse por una 7-desaza, 7-alquil o 7-alquenilpurina.

50 En otra realización, cuando el ANsi es un ARNsi bicatenario, los nucleótidos de proyección de nucleótido en el extremo terminal en 3' se sustituyen por desoxirribonucleótidos (véase en general, Elbashir *et al.*, 2001, Genes Dev, 15:188).

- Formulaciones y vías de administración.

Las moléculas de ANsi usadas de acuerdo con la invención y las formulaciones o composiciones de las mismas se administran por vía tópica (por ejemplo, localmente) al ojo, y la administración es ocular, por ejemplo por medio de

gotas oculares.

Por ejemplo, una molécula de ANsi puede comprender un vehículo de administración, incluyendo liposomas, para la administración a un sujeto. Pueden estar presentes vehículos y diluyentes y sus sales en formulaciones farmacéuticamente aceptables. Pueden administrarse moléculas de ácido nucleico a células mediante una variedad de procedimientos conocidos para el experto en la técnica, incluyendo, pero sin limitarse a, encapsulación en liposomas, mediante iontoforesis, o mediante incorporación en otros vehículos, tales como polímeros biodegradables, hidrogeles, ciclodextrinas, poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) y microesferas de PLCA, nanocápsulas biodegradables y microesferas bioadhesivas, o mediante vectores proteináceos. En otra realización, las moléculas de ácido nucleico de la invención también pueden formularse o formar complejos con polietilenimina y derivados de la misma, tales como derivados de polietileniminopolietilenglicol-N-acetilgalactosamina (PEI-PEG-GAL) o polietilenimino-polietilenglicol-tri-N-acetilgalactosamina (PEI-PEG-triGAL).

Una molécula de ANsi usada de acuerdo con la invención puede formar complejos con agentes disruptivos de membrana y/o un lípido catiónico o una molécula lipídica auxiliar.

Los sistemas de administración descritos en el presente documento incluyen, por ejemplo, geles acuosos y no acuosos, cremas, emulsiones múltiples, microemulsiones, liposomas, pomadas, disoluciones acuosas y no acuosas, lociones, aerosoles, bases de hidrocarburos y polvos, y pueden contener excipientes tales como solubilizadores, potenciadores de la permeación (por ejemplo, ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos, alcoholes grasos y aminoácidos) y polímeros hidrófilos (por ejemplo, policarbófilo y polivinilpirrolidona). En una realización, el vehículo farmacéuticamente aceptable es un liposoma o un potenciador transdérmico.

Una formulación farmacéutica tal como se describe en el presente documento está en una forma adecuada para la administración, por ejemplo, administración sistémica o local, en una célula o un sujeto, incluyendo por ejemplo un ser humano. Las formas adecuadas dependen en parte del uso o la vía de introducción. Otros factores se conocen en la técnica, e incluyen consideraciones tales como toxicidad y formas que evitan que la composición o formulación ejerzan su efecto.

También describen los inventores composiciones preparadas para el almacenamiento o la administración que incluyen una cantidad farmacéuticamente eficaz de los compuestos deseados en un diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable. Se conocen bien en la técnica farmacéutica diluyentes o vehículos aceptables para su uso terapéutico. Por ejemplo, pueden proporcionarse conservantes, estabilizadores, colorantes y agentes aromatizantes. Estos incluyen benzoato de sodio, ácido sórbico y ésteres del ácido p-hidroxibenzoico. Además pueden usarse antioxidantes y agentes de suspensión.

Una dosis farmacéuticamente eficaz es aquella dosis requerida para prevenir, inhibir la aparición, o tratar (aliviar un síntoma hasta cierto grado, preferiblemente todos los síntomas) de un estado patológico. La dosis farmacéuticamente eficaz depende del tipo de enfermedad, la composición usada, la vía de administración, el tipo de mamífero que está tratándose, las características físicas del mamífero específico en consideración, la medicación concurrente y otros factores que los expertos en la técnica médica reconocerán.

En general, se administra una cantidad entre 0,1 mg/kg y 100 mg/kg de peso corporal/día de principios activos.

Las formulaciones tal como se describen en el presente documento pueden administrarse en formulaciones de dosificación unitaria que contienen vehículos, adyuvantes y/o portadores farmacéuticamente aceptables no tóxicos convencionales. También se describen en el presente documento formulaciones que pueden estar en una forma adecuada para su uso oral, por ejemplo, como comprimidos, trociscos, pastillas para chupar, suspensiones acuosas u oleosas, gránulos o polvos dispersables, emulsión, cápsulas duras o blandas, o jarabes o elixires. Pueden prepararse composiciones pretendidas para su uso oral de acuerdo con cualquier procedimiento conocido en la técnica para la fabricación de composiciones farmacéuticas y tales composiciones pueden contener uno o más de tales agentes edulcorantes, agentes aromatizantes, agentes colorantes o agentes conservantes con el fin de proporcionar preparaciones farmacéuticamente atractivas y apetecibles. Los comprimidos contienen el principio activo en mezcla con excipientes farmacéuticamente aceptables no tóxicos que son adecuados para la fabricación de comprimidos.

Estos excipientes pueden ser, por ejemplo, diluyentes inertes; tales como carbonato de calcio, carbonato de sodio, lactosa, fosfato de calcio o fosfato de sodio; agentes de granulación y disgregantes, por ejemplo, almidón de maíz o ácido algínico; agentes aglutinantes, por ejemplo almidón, gelatina o goma arábiga; y agentes lubricantes, por ejemplo estearato de magnesio, ácido esteárico o talco. Los comprimidos pueden estar no recubiertos o pueden estar recubiertos mediante técnicas conocidas. En algunos casos tales recubrimientos pueden prepararse mediante técnicas conocidas para retrasar la disgregación y absorción en el tracto gastrointestinal y proporcionar de ese modo una acción sostenida durante un periodo más largo. Por ejemplo, puede emplearse un material de retardo de tiempo tal como monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo.

También pueden presentarse formulaciones para su uso oral como cápsulas de gelatina dura en las que el principio

activo está mezclado con un diluyente sólido inerte, por ejemplo, carbonato de calcio, fosfato de calcio o caolín, o como cápsulas de gelatina blanda en las que el principio activo está mezclado con agua o un medio oleoso, por ejemplo aceite de cacahuete, parafina líquida o aceite de oliva.

5 Las suspensiones acuosas contienen los materiales activos en una mezcla con excipientes adecuados para la fabricación de suspensiones acuosas. Tales excipientes son agentes de suspensión, por ejemplo carboximetilcelulosa de sodio, metilcelulosa, hidropropilmetilcelulosa, alginato de sodio, polivinilpirrolidona, goma tragacanto y goma arábiga; agentes dispersantes o humectantes pueden ser un fosfátido que se produce de manera natural, por ejemplo, lecitina, o productos de condensación de un óxido de alquileno con ácidos grasos, por ejemplo estearato de polioxietileno, o productos de condensación de óxido de etileno con alcoholes alifáticos de cadena 10 larga, por ejemplo heptadecaetilenoicetanol, o productos de condensación de óxido de etileno con ésteres parciales derivados de ácidos grasos y un hexitol tal como monooleato de polioxietilensorbitol, o productos de condensación de óxido de etileno con ésteres parciales derivados de ácidos grasos y anhídridos de hexitol, por ejemplo monooleato de polietilensorbitano. Las suspensiones acuosas también pueden contener uno o más conservantes, por ejemplo p-hidroxibenzoato de etilo o n-propilo, uno o más agentes colorantes, uno o más agentes aromatizantes 15 y uno o más agentes edulcorantes, tales como sacarosa o sacarina.

Pueden formularse suspensiones oleosas mediante la suspensión de los principios activos en un aceite vegetal, por ejemplo aceite de cacahuete, aceite de oliva, aceite de sésamo o aceite de cono, o en un aceite mineral tal como parafina líquida. Las suspensiones oleosas pueden contener un agente espesante, por ejemplo cera de abeja, parafina dura o alcohol cetílico. Pueden añadirse agentes edulcorantes y agentes aromatizantes para proporcionar 20 preparaciones orales apetecibles.

Estas composiciones pueden conservarse mediante la adición de un antioxidante tal como ácido ascórbico.

Los gránulos y polvos dispersables adecuados para la preparación de una suspensión acuosa mediante la adición de agua proporcionan el principio activo en mezcla con un agente dispersante o humectante, agente de suspensión y uno o más conservantes. Se dan como ejemplo agentes dispersantes o humectantes adecuados mediante los ya 25 mencionados anteriormente. También pueden estar presentes excipientes adicionales, por ejemplo agentes edulcorantes, aromatizantes y colorantes.

Las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento también pueden estar en forma de emulsiones aceite en agua. La fase oleosa puede ser un aceite vegetal o un aceite mineral o mezclas de los mismos. Los agentes de emulsión adecuados pueden ser gomas que se producen de manera natural, por ejemplo 30 goma arábiga o goma tragacanto, fosfátidos que se producen de manera natural, por ejemplo lecitina de soja, y ésteres o ésteres parciales derivados de ácidos grasos y hexitol, anhídridos, por ejemplo monooleato de sorbitano, y productos de condensación de dichos ésteres parciales con óxido de etileno, por ejemplo monooleato de polioxietilensorbitano. Las emulsiones también pueden contener agentes edulcorantes y aromatizantes.

Pueden formularse jarabes y elixires con agentes edulcorantes, por ejemplo glicerol, propilenglicol, sorbitol, glucosa o sacarosa. Tales formulaciones también pueden contener un emoliente, un conservante y agentes aromatizantes y 35 colorantes. Las composiciones farmacéuticas pueden estar en forma de una suspensión oleaginosa o acuosa inyectable estéril.

Esta suspensión puede formularse de acuerdo con la técnica conocida usando aquellos agentes dispersantes o humectantes adecuados y agentes de suspensión que se han mencionado anteriormente.

40 Una preparación inyectable estéril también puede ser una suspensión o disolución inyectable estéril en un disolvente o diluyente parenteralmente aceptable no tóxico, por ejemplo como una disolución en 1,3-butanodiol. Entre los disolventes y vehículos aceptables que pueden emplearse están agua, solución de Ringer y disolución de cloruro de sodio isotónica. Además, se emplean convencionalmente aceites fijados, estériles como disolvente o medio de suspensión. Para este fin puede emplearse cualquier aceite fijado suave incluyendo mono o diglicéridos sintéticos. 45 Además se usan ácidos grasos tales como ácido oleico en la preparación de inyectables.

Las moléculas de ácido nucleico descritas en el presente documento también pueden administrarse en forma de supositorios, por ejemplo, para la administración rectal del fármaco. Estas composiciones pueden prepararse 50 mezclando el fármaco con un excipiente no irritante adecuado que es sólido a temperaturas ordinarias pero líquido a la temperatura rectal y por tanto fundirá en el recto para liberar el fármaco. Tales materiales incluyen manteca de cacao y polietilenglicoles.

Las moléculas de ácido nucleico descritas en el presente documento pueden administrarse parenteralmente en un medio estéril. El fármaco, dependiendo del vehículo y de la concentración usados, puede o bien suspenderse o bien 55 disolverse en el vehículo. Ventajosamente, pueden disolverse en el vehículo adyuvantes tales como anestésicos locales, conservantes y agentes de tamponamiento.

Se entiende que el nivel de dosis específico para cualquier sujeto particular depende de una variedad de factores

incluyendo la actividad del compuesto específico empleado, la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo, la dieta, el tiempo de administración, la vía de administración y la tasa de excreción, la combinación de fármacos y la gravedad de la enfermedad particular que va a someterse a terapia.

5 Para la administración a animales no humanos, la composición también puede añadirse al agua para beber o a la comida del animal. Puede ser conveniente formular las composiciones de agua para beber y comida del animal de modo que el animal toma en una cantidad terapéuticamente apropiada de la composición junto con su dieta. También puede ser conveniente presentar la composición como una mezcla previa para añadirla al agua para beber o la comida.

10 Las moléculas de ácido nucleico descritas en el presente documento también pueden administrarse a un sujeto en combinación con otros compuestos terapéuticos para aumentar el efecto terapéutico global. El uso de compuestos múltiples para tratar una indicación puede aumentar los efectos beneficiosos mientras que se reduce la presencia de efectos secundarios.

15 Como alternativa, ciertas moléculas de ANsi descritas en el presente documento pueden expresarse dentro de células a partir de promotores eucariotas. Pueden administrarse vectores recombinantes que pueden expresar las moléculas de ANsi y persistir en las células diana. Como alternativa, pueden usarse vectores que proporcionan expresión transitoria de moléculas de ácido nucleico. Tales vectores pueden administrarse repetidamente en caso necesario. Una vez expresada, la molécula de ANsi interacciona con el ARNm diana y genera una respuesta de ARNi. La administración de vectores que expresan moléculas de ANsi puede ser sistémica, tal como administración intravenosa o intramuscular, mediante la administración a células diana retiradas de un sujeto seguido de la reintroducción en el sujeto, o mediante cualquier otro medio que permitiría la introducción en la célula diana deseada.

### Procedimiento experimental

#### Síntesis de ANsi

25 Una etapa de apareamiento es necesaria cuando se trabaja con moléculas de ARN monocatenarias. Es crítico que todos las etapas de manipulación se realicen en condiciones libre de RNasa, estériles. Para aparear los ARN, deben cuantificarse primero los oligos mediante absorción de UV a 260 nanómetros (nm). El siguiente protocolo basado en Elbashir *et al.* (2001) se usa entonces para aparear:

- tomar alícuotas por separado y diluir cada oligo de ARN hasta una concentración de 50  $\mu$ M.
- 30 • Combinar 30  $\mu$ l de cada disolución de oligo de ARN y 15  $\mu$ l de 5X tampón de apareamiento. La concentración de tampón final es: acetato de potasio 100 mM, HEPES-KOH 30 mM pH 7,4, acetato de magnesio 2 mM. El volumen final es de 75  $\mu$ l.
- 35 • Incubar la disolución durante 1 minuto at 90°C, centrifugar el tubo durante 15 segundos, dejar reposar durante 1 hora a 37°C, entonces usar a temperatura ambiente. La disolución puede almacenarse congelada a -20°C y se congela-descongela hasta 5 veces. La concentración final de dúplex de ARNsi es normalmente de 20  $\mu$ M.

Como alternativa, pueden adquirirse a partir de los proveedores ARNs ya apareados.

También pueden usarse ácidos nucleicos químicamente modificados. Por ejemplo, un resumen de los tipos de modificación que pueden usarse se proporciona en el documento WO03/070744, el contenido del cual se incorpora en el presente documento por referencia. Se presta atención particular a las páginas 11 a 21 de esta publicación. 40 Otras posibles modificaciones son tal como se describieron anteriormente. El experto será consciente de otros tipos de modificación química que pueden incorporarse en las moléculas de ARN.

#### Sistema “*in vitro*”

Se ha detectado la expresión de TRPV1 en fibras de nervios sensoriales cutáneas, mastocitos, queratinocitos epidérmicos, vasos sanguíneos dérmicos, la vaina radicular interna y el infundíbulo de folículos pilosos, sebocitos diferenciados, conductos de glándulas sudoríparas y la parte secretora de las glándulas sudoríparas ecquinas mediante ensayos de inmunorreactividad (Stander *et al.*, 2004). Tras la reacción en cadena de la polimerasa mediante transcriptasa inversa y análisis de inmunotransferencia tipo Western, se ha detectado TRPV1 en mastocitos y queratinocitos de piel humana (Stander *et al.*, 2004). Recientemente, las células dendríticas también han demostrado que expresan TRPV1 (Basu & Srivastava, 2005) y se han desarrollado modelos de células 50 neuronales con células que expresan TRPV1 (Lilja & Forsby, 2004).

Se usan cultivos celulares que expresan el gen diana TRPV1 para unas pruebas preliminares de la especificidad de interferencia de ARNsi. Las células se incuban con los correspondientes dúplex de ARNsi y se lleva a cabo el

análisis de la regulación por disminución de la expresión del gen diana. Para asociar el silenciamiento de ARNsi a fenotipos específicos en células cultivadas, es necesario demostrar la reducción de la proteína seleccionada como diana o al menos demostrar la reducción del ARNm seleccionado como diana.

- 5 Pueden cuantificarse niveles de ARNm del gen diana mediante PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR). Además, pueden determinarse los niveles de proteína en una variedad de modos bien conocidos en la técnica, tales como análisis de inmunotransferencia tipo Western con anticuerpos específicos frente a la diana, que permiten monitorizar directamente la reducción de la proteína seleccionada como diana.

### Transfección de dúplex de ARNsi en cultivos celulares

- 10 Varios ejemplos de técnicas bien conocidas en la técnica son los siguientes: puede realizarse una única transfección de dúplex de ARNsi usando un lípido catiónico, tal como reactivo de transfección RNAiFect (Qiagen) y reactivo Lipofectamine 2000 (Invitrogen) y un ensayo para el silenciamiento 24, 48 y 72 horas tras la transfección.

- 15 Puede realizarse un protocolo de transfección típica tal como sigue: para un pocillo de una placa de 6 pocillos, se transfecta usando 100 nM como concentración final de ARNsi. Siguiendo el protocolo de RNAiFect, se siembra en placa el día antes de la transfección,  $2-4 \times 10^5$  células por pocillo en 3 ml de un medio de crecimiento apropiado, que contenía DMEM, suero al 10%, antibióticos y glutamina, y se incuban las células en condiciones de crecimiento normales (37°C y el 5% de CO<sub>2</sub>). En el día de la transfección, las células han de estar en el 30-50% de confluencia. Se diluyen 15 ul de dúplex de ARNsi 20 uM (correspondiente a la concentración final 100 nM) en 85 ul de tampón EC-R, para proporcionar un volumen final de 100 ul, y se mezcla mediante agitación con vórtex. Para la formación de complejos se añaden 19 ul de reactivo de transfección RNAiFect hasta obtener el ARNsi diluido y se mezclan pipeteando o agitando con vórtex. Tras la incubación de las muestras durante 10-15 minutos a temperatura ambiente para permitir la formación de complejos de transfección, se añaden los complejos gota a gota en las células con 2,9 ml de medio de crecimiento nuevo con bajo contenido en antibióticos. Tras agitar las placas para asegurar la distribución uniforme de los complejos de transfección, se incuban las células en condiciones de crecimiento normales. Al día siguiente, se retiran los complejos y se añade medio de crecimiento completo y nuevo.
- 25 Para monitorizar el silenciamiento génico, se recogen las células a las 24, 48 y 72 horas tras la transfección. El protocolo del reactivo Lipofectamine 2000 es bastante similar. El día antes de la transfección se siembran en placa  $2-4 \times 10^5$  células por pocillo en 3 ml de un medio de crecimiento apropiado, que contiene DMEM, suero al 10%, antibióticos y glutamina, y se incuban las células en condiciones de crecimiento normales (37°C y el 5% de CO<sub>2</sub>). En el día de la transfección, las células han de estar en el 30-50% de confluencia. Se diluyen 12,5 ul de dúplex de ARNsi 20 uM (correspondiente a la concentración final 100 nM) en 250 ul de DMEM, para proporcionar un volumen final 262,5 ul, y se mezclan. Además, se diluyen 6 ul de Lipofectamine 2000 en 250 ul de DMEM y se mezclan. Tras una incubación de 5 minutos a temperatura ambiente, se combinan el oligómero diluido y el Lipofectamine diluido para permitir la formación de complejos durante una incubación de 20 minutos a temperatura ambiente. Después de esto se añaden los complejos gota a gota en las células con 2 ml de medio de crecimiento nuevo con bajo contenido en antibióticos y se mezclan suavemente balanceando la placa hacia atrás y hacia delante, para asegurar la distribución uniforme de los complejos de transfección. Se incuban las células en condiciones de crecimiento normales y al día siguiente, se retiran los complejos y se añade medio de crecimiento completo y nuevo. Para monitorizar el silenciamiento génico, se recogen las células a las 24, 48 y 72 horas tras la transfección.

- 40 La eficacia de la transfección puede depender del tipo de célula, pero también del número de pases y la confluencia de las células. También son críticos el tiempo y la manera de formación de complejos de ARNsi-liposomas (por ejemplo, inversión frente a agitación con vórtex). Las bajas eficacias de transfección son la causa más frecuente del silenciamiento no satisfactorio. Una buena transfección no es un asunto trivial y necesita examinarse cuidadosamente cada línea de células nueva que va a usarse. La eficacia de la transfección puede someterse a prueba transfectando genes indicadores, por ejemplo un plásmido de expresión de EGFP conducido por CMV (por ejemplo de Clontech) o un plásmido de expresión de B-Gal, y entonces se evalúa mediante contraste de fases y/o microscopía de fluorescencia al siguiente día.

### Pruebas de dúplex de ARNsi

- 50 Dependiendo de la abundancia y el tiempo de vida (o renovación) de la proteína seleccionada como diana, un fenotipo silenciado puede volverse evidente tras 1 a 3 días, o incluso más tarde. En casos en los que no se observa ningún fenotipo, puede observarse la disminución de la proteína mediante inmunofluorescencia o inmunotransferencia tipo Western.

- 55 Tras las transfecciones, se tratan previamente las fracciones de ARN total extraídas de células con DNasa I y se usan para la transcripción inversa usando un cebador aleatorio. Se lleva a cabo una amplificación por PCR con un par de cebadores específicos que cubren al menos una unión exón-exón con el fin de controlar la amplificación de ARNm previos. También se necesita como control la RT/PCR de un ARNm no seleccionado como diana. La disminución eficaz de la reducción aún indetectable de ARNm de la proteína diana puede indicar que puede existir en la célula una gran reserva de proteína estable. Como alternativa, puede usarse la amplificación por PCR en

tiempo real para someter a prueba de un modo más preciso la desaparición o reducción de ARNm. La PCR mediante transcriptasa inversa (RT) en tiempo real cuantifica la cantidad inicial del molde de la manera más específica, sensible y reproducible. La PCR en tiempo real monitoriza la fluorescencia emitida durante la reacción como indicador de la producción de amplicones durante cada ciclo de PCR, en un aparato lightcycler. Esta señal aumenta en proporción directa con la cantidad de producto de PCR en una reacción. Mediante el registro de la cantidad de emisión de fluorescencia en cada ciclo, es posible monitorizar la reacción de PCR durante la fase exponencial en la que el primer aumento significativo de la cantidad de producto de PCR está correlacionado con la cantidad inicial del molde diana.

Para verificar el patrón de interferencia del gen TRPV1 en los cultivos de células, se realiza una qRT-PCR de acuerdo con el protocolo del fabricante. Para la qRT-PCR cuantitativa, se usan aproximadamente 250-500 ng de ARN total para la transcripción inversa seguida de la amplificación por PCR con cebadores específicos para TRPV1 en la mezcla de reacción que contiene Master SYBR. Green I. Las condiciones de PCR básicas comprenden una etapa inicial de 30 min. a 91°C, seguido de 40 ciclos de 5 s a 95°C, 10 s a 62°C y 15 s a 72°C. Puede usarse la cuantificación de ARNm de b-actina como control para la normalización de datos. Las comparaciones de la expresión génica relativas funcionan mejor cuando la expresión génica del control interno/endógeno elegido es más abundante y permanece constante, en proporción con el ARN total, entre las muestras. Mediante el uso de un control endógeno invariante como referencia activa, la cuantificación de una diana de ARNm puede normalizarse para las diferencias en la cantidad de ARN total añadido a cada reacción. Las curvas de amplificación obtenidas con el lightcycler se analizan en combinación con el ARN del kit control, que selecciona como diana al molde de ARN de citocina transcrito *in vitro*, de acuerdo con el protocolo del fabricante. Con el fin de evaluar la especificidad del producto de PCR amplificado se realiza un análisis de curvas de fusión. Las curvas de fusión resultantes permiten la discriminación entre dímeros de cebadores y producto de PCR específico.

#### Estudios en animales

El efecto del silenciamiento *in vivo* de moléculas de ANsi sobre niveles de expresión de TRPV1 puede someterse a prueba en un modelo de córnea de cobaya tal como el descrito por Brock *et al.* Tetrodotoxin-resistant impulses in single nociceptor nerve terminals in guinea-pig cornea. J Physiol. 1 de octubre de 1998;512 (Pt 1):211-7.

El procedimiento básico consiste en la instilación de la molécula de ANsi que va a someterse a prueba, contenida en un pequeño volumen, en la superficie de la córnea de cobaya. Se tratan ojos contralaterales con el vehículo solo y pueden usarse como controles en cada experimento para que no exista un fenómeno simpático con el otro ojo. Deben suprimirse múltiples experimentos en el mismo animal. Pueden llevarse a cabo registros extracelulares de la actividad eléctrica de axones sensoriales de córnea de cobaya control o tratada con ANsi tal como se describe en Brock *et al.* en 1998. Básicamente, se colocan ojos de cobayas (150-300 g, sacrificadas con 100 mg kg<sup>-1</sup> de pentobarbitona I.P.) en una cámara de registro y se superfunden con solución salina fisiológica de la siguiente composición (mM): Na<sup>+</sup>, 151; K<sup>+</sup>, 47; Ca<sup>2+</sup>, 2; Mg<sup>2+</sup>, 1,2; Cl<sup>-</sup>, 144; H<sub>2</sub>PO<sub>3</sub><sup>-</sup>, 1,3; HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, 16,3; y glucosa, 9,8. Esta disolución se gasifica con el 95% de O<sub>2</sub>-5% de CO<sub>2</sub> (a pH 7,4) y se mantiene a 31-33°C. El nervio óptico y los nervios ciliares asociados se arrastran hacia dentro de un electrodo estimulador de succión. Los parámetros de estímulo se modifican tal como se requiera por todo el experimento (anchura de pulso, 0-1-0,5 ms, 5-30 V). Un electrodo de registro de vidrio (diámetro exterior de la punta, 50 µm) relleno con solución salina fisiológica se aplica a la superficie del epitelio corneal con succión ligera. Se registra la actividad eléctrica a través de un amplificador AC (Neurolog NL104, Digitimer Ltd, Welwyn Garden City, RU; aumento, 2000; filtro de paso alto fijado a 0,1 Hz) y los resultados se digitalizan a 44 kHz y se almacenan en una cinta magnética usando una grabadora PCM (A. R. Vetter Co. Inc., Rebersburg, PA, EE.UU.). Sólo se realizan registros desde sitios en los que los impulsos nerviosos se distinguen fácilmente del ruido (10 µV de pico a pico cuando se realiza un filtro de paso bajo a 3-5 kHz). En muchos sitios en la córnea, se registra la actividad eléctrica no provocada o espontánea o las señales son demasiado pequeñas para analizarse. Se logra la perfusión interna del electrodo de registro mediante la inserción de un tubo de plástico fino hasta dentro de 200 µm de la punta de electrodo (véase Brock & Cunnane, 1995, Effects of Ca<sup>2+</sup> y K<sup>+</sup> channel blockers on nerve impulses recorded from postganglionic sympathetic nerve terminals. The Journal of Physiology 489, 389-402). Se usa un sistema de adquisición de datos MacLab (ADInstruments Pty Ltd, Castle Hill, NSW, Australia) para digitalizar (frecuencias de muestreo, 10-20 kHz) señales electrofisiológicas registradas previamente en una cinta. Antes de la digitalización, las señales se filtran usando un filtro de paso bajo (corte, 3-5 kHz). Se realiza el análisis posterior con el programa informático Igor Pro (Wavemetrics, Lake Oswego, OR, EE.UU.). Pueden cuantificarse niveles de ARNm de TRPV1 mediante PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR) mientras que puede monitorizarse directamente la reducción de los niveles de proteína en una variedad de modos bien conocidos en la técnica, tales como análisis de inmunotransferencia tipo Western con anticuerpos específicos frente a la diana.

Puede monitorizarse la regulación por disminución de la expresión de TRPV1 mediante ANsi en el folículo piloso por medio de los siguientes modelos representativos sin excluir otros modelos de animales en la técnica:

- Transfección del folículo piloso de ratón *in vivo*. Con anestesia general, se corta el pelo de la piel dorsal de ratones Balb/c de 50 días de edad (Charles River, Wilmington, MA) y se trata con una crema depilatoria o

- máquina de afeitar (Neet; Premier Consumer Products, Inc., Englewood, NJ) durante 5 min. En diferentes momentos tras la depilación, se aplican por vía tópica 50 µl de lipoplex que contienen 50 mg de lípido y cantidades diferentes de ARNsi individuales junto con 10 mg de pCMV-b-gal a 1 cm<sup>2</sup> de piel dorsal en alícuotas de 5 ml usando una micropipeta más de 90 min. Las cantidades de ADN son similares a los estudios publicados previamente. Se trata la piel control con un ARNsi desordenado junto con 10 mg de plásmido desnudo o 50 mg de lípido solo. Se recoge la piel transfectada 24 ó 48 h tras la transfección, y se tiñe para determinar la actividad de b-gal.
- Modelo de xenoinjerto. Se mantienen ratones macho CB-17 lcr-scid/scid de cuatro semanas de edad (Charles River, Wilmington, MA) en condiciones libre de patógenos. Se injerta cuero cabelludo fetal humano (20 semanas de gestación de Advanced Bio-science Resources, Alameda, CA), o cuero cabelludo adulto humano a partir de cirugía cosmética en el plazo de 24 h de la recogida. Se realiza la cirugía de injerto en una campana de flujo laminar usando procedimientos estériles. Se anestesian ratones con mezcla de ketamina-xilazina, tras lo que se corta el pelo en el dorso. Se injertan trozos de piel que miden 1x1 cm en un lecho de tamaño similar que se había preparado retirando piel de ratón hacia abajo de la fascia. Se mantienen en su sitio los injertos de piel humana (normalmente dos por ratón) con sutura de monofilamento no absorbible 6-0. Se recubren los trasplantes con petrolato y se cubren con Tegaderm (3M Health Care Ltd. (St. Paul, MN)), y vendaje estéril. Se retiran las vendas tras dos a tres semanas, y se dejan cicatrizar los injertos durante dos a tres semanas adicionales antes de proceder con los experimentos.
  - Transfección de xenoinjertos humanos *in vivo*. Antes de la transfección se depilan los xenoinjertos. Algunos injertos también se tratan con crema de ácido retinoico al 0,05% (Retin-A, Johnson & Johnson, Raritan, NJ) cada dos días durante una semana. En el día de la transfección se anestesian los ratones y se prehidratan los xenoinjertos con PBS durante 15 min. Después de que se mezclen 75 mg de lípido pFx-1 y 30 mg de pCMV-b-gal con o sin ARNsi individuales en OPTI-MEM, se pipetea por vía tópica la mezcla en alícuotas de 5 µl (total de 75 µl) a la piel injertada cada dos días durante tres días. Se usan dosis superiores de ADN y liposomas en transfecciones humanas frente a de ratón debido al estrato córneo más grueso, que podría absorber potencialmente el lipoplex y evitar la administración adecuada al folículo. Se recoge la piel 48 h tras la transfección y se trata para determinar la actividad de b-gal.
  - Ensayos histoquímicos. Se fijan muestras de tejido de ratón y humano en formaldehído al 2%/glutaraldehído al 0,2% preparado recientemente en PBS a 4°C durante 2-4 h, entonces se lavan en tres cambios de PBS a temperatura ambiente durante 1 h. Se incuba el tejido fijado a 37°C durante la noche en 1 mg ml<sup>-1</sup> de X-gal en PBS. Entonces se lava el tejido con PBS, se fija en formalina, y se incrusta en parafina. Se contratiñen cortes de 5 mm con rojo nuclear rápido. Pueden teñirse también biopsias fijadas con anticuerpos específicos para someter a prueba la inhibición de la expresión de TRPV1. Se realiza la tinción tal como se notificó anteriormente. Algunos cortes de biopsia se mantienen en ARN later (Ambion) y se trata para la purificación de ARN. Se analiza el ARN total usando cebadores/sondas específicos para determinar la interferencia específica tras tratamientos con ARNsi individuales.

## **Ejemplos**

### **Ejemplo 1**

Con el fin de determinar si se modificó la respuesta de comportamiento a la aplicación tópica del agonista de TRPV1 capsaicina mediante tratamiento previo con ARNsi preparado frente al TRPV1 de cobaya, se llevaron a cabo experimentos en cobayas machos, adultos.

1-Efecto de capsaicina tópica.

Se trataron dos cobayas con gota de 10 µl de una disolución de capsaicina 0,1 mM en el ojo derecho y 10 µl de solución salina isotónica estéril en el ojo izquierdo.

En los siguientes 5 min. tras la aplicación tópica se midieron los siguientes parámetros:

- frecuencia de parpadeo
- tiempo de cierre del párpado
- movimientos de rascado (con la extremidad trasera) y movimientos de lavado (con la pata delantera) dirigidos al ojo tratado.

Tras este periodo de 5 min. se evaluaron los siguientes parámetros:

- hiperemia conjuntival y edema palpebral
- lagrimeo (con una tira de Schirmer mantenida 3 min. en el saco subconjuntival).

Se realizaron experimentos a las 9:00 am durante 4 días consecutivos. Se trataron ambos ojos simultáneamente con la disolución correspondiente, y se midieron los parámetros simultáneamente mediante un observador independiente para cada ojo. Todos los parámetros medidos eran superiores en el ojo tratado con capsaicina cuando se compararon con el control (tratado con solución salina). Los parámetros que se alteraron de la manera más

constante eran el número de movimientos de rascado/lavado, hiperemia y lagrimeo.

La figura 4 resume los resultados obtenidos en 2 animales. Es evidente que capsaicina provocó movimientos de rascado/lavado, hiperemia conjuntival y lagrimeo que estaban ausentes en el lado tratado con solución salina. Además, no se observó desensibilización a aplicaciones repetidas durante días sucesivos.

- 5 2-Efecto de oligonucleótido 3 (ON3), que corresponde a SEC ID N° 146 con proyecciones dTdT en ambos extremos 3', sobre la respuesta a capsaicina.

10 El efecto atenuante de ON3 sobre la respuesta de comportamiento a capsaicina tópica se exploró inicialmente en un grupo de 4 cobayas. Se aplicaron por vía tópica dos dosis de 15 µl de una disolución que contenía el ON3 al ojo derecho (ojo tratado) a las 9:00 am durante los días 0, 1 y 2. A las 3:00 pm durante los días 1, 2, 3, 4, 7, 8 y 9, se aplicaron 10 µl de disolución de capsaicina 0,1 mM a ambos ojos y se midió la respuesta de comportamiento al fármaco en cada ojo, de acuerdo con los procedimientos descritos anteriormente.

15 Tal como se muestra en la figura 5, ON3 provocó una reducción de la respuesta de comportamiento (número de movimientos de rascado/lavado) a la aplicación de capsaicina en comparación con los animales no tratados. Esta reducción se estableció gradualmente, comenzando el día 2 y aumentando en días sucesivos. Siete días tras el tratamiento, todavía estaban presentes las diferencias en la respuesta entre ojos tratados con ON3 y no tratados. Por el contrario, la secreción de lágrimas no era diferente entre ambos ojos.

La figura 6 resume la reducción promedio del número de movimientos de rascado/lavado en todos los animales estudiados, presentada en valores absolutos (gráfica superior) y como porcentaje de reducción en el lado tratado a partir del lado control, en los diversos días tras el tratamiento.

## 20 Ejemplo 2

25 Se disecaron ojos de cobayas profundamente anestesiadas de sus orbitas y se colocaron en una cámara de registro dividida. Se perfundió continuamente el ojo con disolución fisiológica de la siguiente composición (mM): Na<sup>+</sup>, 151; K<sup>+</sup>, 4,7; Ca<sup>2+</sup>, 2; Mg<sup>2+</sup>, 1.2; Cl<sup>-</sup>, 144,5; H<sub>2</sub>PO<sub>3</sub><sup>-</sup>, 1,3; HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, 16,3; glucosa, 7,8. Se gasificó esta disolución con carbógeno (el 95% de O<sub>2</sub>, el 25% de CO<sub>2</sub>) a pH 7,4 y se mantuvo a aproximadamente 34°C con un dispositivo Peltier. Se registró la actividad de las fibras nerviosas de la córnea individuales a partir de los nervios ciliares en la parte trasera del ojo. La configuración de registro se muestra esquemáticamente en la figura 7.

30 Ojos control: se registró la actividad neural a partir de 20 fibras polimodales obtenidas de 10 ojos de cobaya identificados por su respuesta a la estimulación mecánica y por su respuesta a un chorro de gas que contenía CO<sub>2</sub> (98%). En cada fibra se aplicó una secuencia de estímulos: una gota de capsaicina 0,1 mM seguida de lavado 30 s más tarde. Solución salina caliente a 45°C durante 1 min., pulso de CO<sub>2</sub> aplicado durante 30 s. Entre cada estímulo se dejó una pausa de 5 min. Se aplicaron tres de estas secuencias por fibra individual con un intervalo de 15 min. entre ciclos de estimulación. Se realizó la cuantificación de la respuesta midiendo el número total de impulsos provocados por cada estímulo durante el periodo de estimulación.

35 Ojos tratados: en 5 cobayas, se trataron ambos ojos con 15 µl de una disolución que contenía ON3 a las 9:00 am cada dos días durante tres días consecutivos. En el cuarto día, se enuclearon ambos ojos y se estudiaron "in vitro" tal como se describió anteriormente.

40 Se identificaron en estos ojos nueve fibras identificadas como fibras nociceptoras polimodales. El mismo protocolo de estimulación usado para los ojos control, concretamente estímulos de capsaicina, calor y CO<sub>2</sub> aplicados secuencialmente con una pausa de 5 min. entre estímulos, se repitió tres veces por fibra. La cuantificación de la respuesta a cada uno de estos estímulos mostró que el número de impulsos provocados era significativamente inferior en animales tratados con ON3. La reducción de la respuesta en comparación con los ojos control era: del 60% para la estimulación con capsaicina, del 56% para la estimulación con calor y del 40% para la estimulación ácida.

## REIVINDICACIONES

1. Uso de una dosis farmacéuticamente eficaz de ANsi dirigido frente a TRPV1 en la preparación de un fármaco para su uso en el tratamiento de un estado ocular **caracterizado por** un aumento de la expresión y/o actividad de TRPV1, en el que dicho fármaco se administra por vía tópica a la superficie de la córnea.
- 5 2. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la administración es mediante el uso de gotas oculares.
3. El uso de acuerdo con la reivindicación 1 o reivindicación 2, en el que el estado ocular se selecciona del grupo que comprende molestia y sensibilidad alterada de la córnea tras cirugía refractiva, uso de lentes de contacto, ojos secos, retinopatía diabética y otras patologías oculares.
4. El uso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en el que el ANsi es ARNsi.
- 10 5. El uso de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el ARNsi es ARNds o ARNsh.
6. El uso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en el que el ANsi comprende un oligonucleótido modificado en el que dicha modificación se selecciona de enlaces internucleotídicos de fosforotioato, 2'-O-metilribonucleótidos, 2'-desoxi-fluororribonucleótidos, 2'-desoxirribonucleótidos, nucleótidos de "base universal", 5-C-metilnucleótidos, incorporación desoxiabásica invertida, entrecruzamiento químico entre las dos cadenas complementarias de un ARNsi, modificación química de un extremo terminal en 3' o 5' de una cadena de un ARNsi, modificaciones de azúcares, modificaciones de nucleobases y/o modificaciones de la estructura principal, ribonucleótidos 2'-fluoro-modificados y 2'-desoxirribonucleótidos, sustitución de un nucleótido de pirimidina no modificada por una 2-tio, 5-alquil, 5-metil o 5-propinilpirimidina o sustitución de una purina no modificada por una 7-desaza, 7-alquil o 7-alquencilpurina.
- 15 7. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que se usa una pluralidad de especies de ANsi.
8. El uso de acuerdo con la reivindicación 7, en el que dicha pluralidad de especies selecciona como diana a la misma especie de ARNm.
9. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el ANsi selecciona como diana a una secuencia seleccionada de SEC ID N<sup>os</sup> 1 a SEC ID N<sup>os</sup> 81 o a una secuencia que comprende una secuencia seleccionada de SEC ID N<sup>os</sup> 1 a SEC ID N<sup>os</sup> 81.
- 20 10. El uso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en el que las moléculas de ANsi de la invención comprenden secuencias de nucleótidos seleccionadas del grupo de SEC ID N<sup>os</sup> 82 a SEC ID N<sup>os</sup> 162.
11. El uso de acuerdo con la reivindicación 10, en el que moléculas de ANsi contienen proyecciones en 3'.
- 30 12. ANsi dirigido frente a TRPV1 para su uso en el tratamiento de un estado ocular **caracterizado por** un aumento de la expresión y/o actividad de TRPV1, en el que se administra dicho ANsi, en el que dicho fármaco se administra por vía tópica a la superficie de la córnea.
13. Un compuesto de ANsi que selecciona como diana a TRPV1 que comprende una secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de nucleótidos de SEC ID N<sup>o</sup>: 65.
- 35 14. Un compuesto de ANsi de acuerdo con la reivindicación 13 que comprende la secuencia de nucleótidos descrita en SEC ID N<sup>o</sup>: 146.
15. Un compuesto de ANsi de acuerdo con la reivindicación 14 que comprende la SEC ID N<sup>o</sup> 146 con proyecciones en ambos extremos en 3', en el que ambas proyecciones son dTdT.
16. El ANsi de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15, en el que el ANsi es ARNsi.
- 40 17. El ANsi de acuerdo con la reivindicación 16, en el que el ARNsi es ARNds o ARNsh.
18. El ANsi de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 13 a 17, en el que el ANsi comprende un oligonucleótido modificado en el que dicha modificación se selecciona de enlaces internucleotídicos de fosforotioato, 2'-O-metilribonucleótidos, 2'-desoxi-fluororribonucleótidos, 2'-desoxirribonucleótidos, nucleótidos de "base universal", 5-C-metilnucleótidos, incorporación desoxiabásica invertida, entrecruzamiento químico entre las dos cadenas complementarias de un ARNsi, modificación química de un extremo terminal en 3' o 5' de una cadena de un ARNsi, modificaciones de azúcares, modificaciones de nucleobases y/o modificaciones de la estructura principal, ribonucleótidos 2'-fluoro-modificados y 2'-desoxirribonucleótidos, sustitución de un nucleótido de pirimidina no modificada por una 2-tio, 5-alquil, 5-metil o 5-propinilpirimidina o sustitución de una purina no modificada por una 7-desaza, 7-alquil o 7-alquencilpurina.
- 45

19. Un ANsi de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 13 a 18 para su uso como fármaco.
20. El uso de una dosis farmacéuticamente eficaz de ANsi de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 13 a 18 en la preparación de un fármaco para su uso en un procedimiento de tratamiento de un estado ocular caracterizado por un aumento de la expresión y/o actividad de TRPV1, en el que dicho fármaco se administra por vía tópica a la superficie de la córnea.
- 5
21. Un ANsi de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 13 a 18 para su uso en el tratamiento de un estado ocular caracterizado por un aumento de la expresión y/o actividad de TRPV1, en el que dicho ANsi se administra por vía tópica a la superficie de la córnea.
22. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 13 a 18.
- 10

Figura 1

Número de registro	Definición
NM_080704	Canal catiónico de potencial receptor transitorio, subfamilia V, miembro 1 (TRPV1), variante de transcrito 1, ARNm
NM_018727	Canal catiónico de potencial receptor transitorio, subfamilia V, miembro 1 (TRPV1), variante de transcrito 2, ARNm
NM_080706	Canal catiónico de potencial receptor transitorio, subfamilia V, miembro 1 (TRPV1), variante de transcrito 3, ARNm
NM_080705	Canal catiónico de potencial receptor transitorio, subfamilia V, miembro 1 (TRPV1), variante de transcrito 4, ARNm

Figura 2

Canal catiónico de potencial receptor transitorio, subfamilia V, miembro 1 (TRPV1)	
SEC ID 1	GAAATGGAGCAGCACAGAC
SEC ID 2	ATGGAGCAGCACAGACTTG
SEC ID 3	TGGAGCAGCACAGACTTGG
SEC ID 4	AAGGACACCTGCCAGACC
SEC ID 5	GACCCTCAGGCTCTATGAT
SEC ID 6	GCCGTTGCTCAGAATAACT
SEC ID 7	TAAGTCCAGGATCTGGAG
SEC ID 8	CTGCCAGGATCTGGAGAGC
SEC ID 9	GAGCAAGAAGCACCTCAC
SEC ID 10	GAAGCACCTCACAGACAAC
SEC ID 11	GCACCTCACAGACAACGAG
SEC ID 12	CGAGTTCAAAGACCCTGAG
SEC ID 13	AGACCCTGAGACAGGGAAG
SEC ID 14	GACCCTGAGACAGGGAAGA
SEC ID 15	GACCTGTCTGCTGAAAGCC
SEC ID 16	AGCCATGCTCAACCTGCAT
SEC ID 17	GCCATGCTCAACCTGCATG
SEC ID 18	CCTGCATGACGGACAGAAC
SEC ID 19	ACGGACAGCCTGAAGGAGC
SEC ID 20	CGGACAGCCTGAAGGAGCT
SEC ID 21	GGAGCTTGTCAACGCCAGC
SEC ID 22	GAAAACCAAAGGGCGGCCT
SEC ID 23	AACCAAAGGGCGGCCTGGA
SEC ID 24	ACCAAAGGGCGGCCTGGAT
SEC ID 25	CCAAAGGGCGGCCTGGATT
SEC ID 26	AGGGCGGCCTGGATTCTAC
SEC ID 27	GGGCGGCCTGGATTCTACT
SEC ID 28	CCAGCTGGGCATCGTGAAG
SEC ID 29	GTTCTGCTGCAGAACTCC
SEC ID 30	CACGGCCGACAACACGAAG
SEC ID 31	CACGAAGTTTGTGACGAGC
SEC ID 32	GTTTGTGACGAGCATGTAC
SEC ID 33	TGAGATTCTGATCCTGGGG
SEC ID 34	ACTGCACCCGACGCTGAAG
SEC ID 35	GCTGGAGGAGCTACCAAC
SEC ID 36	CAAGAAGGGAATGACGCCG
SEC ID 37	GAAGGGAATGACGCCGCTG
SEC ID 38	GATCGGGGTCTTGGCCTAT
SEC ID 39	GTTACCGAGTGGGCCTAC
SEC ID 40	GAACTCGGTGCTGGAGGTG
SEC ID 41	CTCGGTGCTGGAGGTGATC
SEC ID 42	TCGCCACGACATGCTCTTG
SEC ID 43	CCGACTCCTGCAGGACAAG
SEC ID 44	GTGGGACAGATTCGTCAAG
SEC ID 45	GCGCATCTTCTACTTCAAC

SEQ ID 46	CTTCCTGGTCTACTGCCTG
SEQ ID 47	GATGGAAAAAATTGGAGAC
SEQ ID 48	AAATTGGAGACTATTTCCG
SEQ ID 49	AATTGGAGACTATTTCCGA
SEQ ID 50	ATTGGAGACTATTTCCGAG
SEQ ID 51	TTGGAGACTATTTCCGAGT
SEQ ID 52	GACCCTGTTTGTGGACAGC
SEQ ID 53	GGAGTATGTGGCTTCCATG
SEQ ID 54	CATGCTCTACTACACCCGC
SEQ ID 55	GATGATCCTGAGAGACCTG
SEQ ID 56	GACGGGAAGAATGACTCCC
SEQ ID 57	GAATGACTCCCTGCCGTCT
SEQ ID 58	TGACTCCCTGCCGTCTGAG
SEQ ID 59	CAGCCTGTACTCCACCTGC
SEQ ID 60	GTTACCATCGGCATGGGC
SEQ ID 61	CTATGACTTCAAGGCTGTC
SEQ ID 62	GGCTGTCTTCATCATCCTG
SEQ ID 63	TTCTCACCTACATCCTCCT
SEQ ID 64	CATGCTCATCGCCCTCATG
SEQ ID 65	CAAGATCGCACAGGAGAGC
SEQ ID 66	GATCGCACAGGAGAGCAAG
SEQ ID 67	GAACATCTGGAAGCTGCAG
SEQ ID 68	CATCTGGAAGCTGCAGAGA
SEQ ID 69	GCTGCAGAGAGCCATCACC
SEQ ID 70	GAGCTTCCTTAAGTGCATG
SEQ ID 71	GTGCATGAGGAAGGCCTTC
SEQ ID 72	CTGGACCACCTGGAACACC
SEQ ID 73	CACCAACGTGGGCATCATC
SEQ ID 74	CGTGGGCATCATCAACGAA
SEQ ID 75	CGAAGACCCGGGCAACTGT
SEQ ID 76	GCAGAGTTTCAGGCAGACA
SEQ ID 77	GAACTTTGCCCTGGTCCCC
SEQ ID 78	CTTTGCCCTGGTCCCCCTT
SEQ ID 79	GAGAGGCAAGTGTCTGAGA
SEQ ID 80	GTGCTCGAGATAGGCAGTC
SEQ ID 81	GTTTATCTGCGACAGTTTT

Figura 3

**Canal catiónico de potencial receptor transitorio,  
subfamilia V, miembro 1 (TRPV1)**

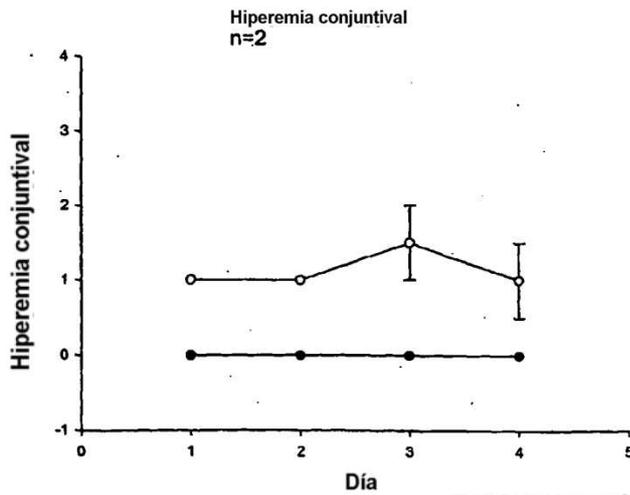
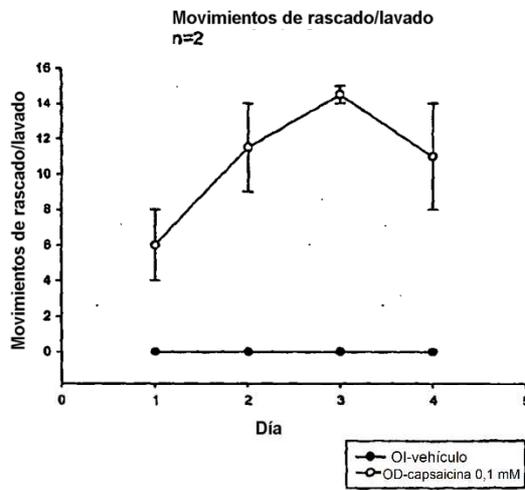
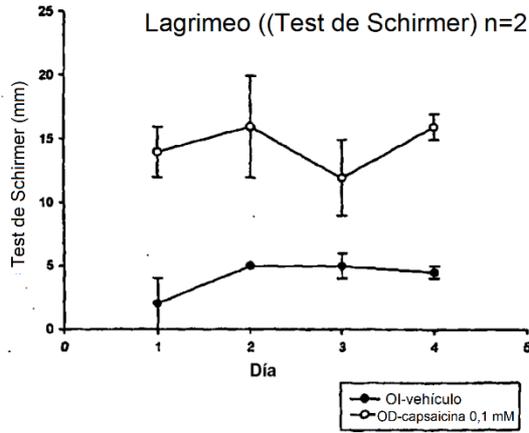
	5'	GAAUUGGAGCAGCACAGAC	3'
SEC ID 82			
	3'	CUUUACCUCGUCGUGUCUG	5'
	5'	AUGGAGCAGCACAGACTUG	3'
SEC ID 83			
	3'	UACCUCGUCGUCGUGAAC	5'
	5'	UGGAGCAGCACAGACUUGG	3'
SEC ID 84			
	3'	ACCUCGUCGUCGUGAACC	5'
	5'	AAGGACACCUGCCAGACC	3'
SEC ID 85			
	3'	UUCUGUGGACGGGUCUGG	5'
	5'	GACCCUCAGGCUCUAUGAU	3'
SEC ID 86			
	3'	CUGGGAGUCCGAGAUACUA	5'
	5'	GCCGUUGCUCAGAAUAACU	3'
SEC ID 87			
	3'	CGGCAACGAGUCUUAUUGA	5'
	5'	UAAUCGCCAGGAUCUGGAG	3'
SEC ID 88			
	3'	AUUGACGGUCCUAGACCUC	5'
	5'	CUGCCAGGAUCUGGAGAGC	3'
SEC ID 89			
	3'	GACGGUCCUAGACCUCUCG	5'
	5'	GAGCAAGAAGCACCUCACA	3'
SEC ID 90			
	3'	CUCGUUCUUCGUGGAGUGU	5'
	5'	GAAGCACCUCACAGACAAC	3'
SEC ID 91			
	3'	CUUCGUGGAGUGUCUGUUG	5'
	5'	GCACCUCACAGACAACGAG	3'
SEC ID 92			
	3'	CGUGGAGUGUCUGUUGCUC	5'
	5'	CGAGUUCAAGACCCUGAG	3'
SEC ID 93			
	3'	GCUCAAGUUUCUGGGACUC	5'
	5'	AGACCCUGAGACAGGGAAG	3'
SEC ID 94			
	3'	UCUGGGACUCUGCCCUUC	5'
	5'	GACCCUGAGACAGGAAGA	3'
SEC ID 95			
	3'	CUGGGACUCUGUCCUUCU	5'
	5'	GACCCUGUCUGUGAAAGCC	3'
SEC ID 96			
	3'	CUGGACAGACGACUUUCGG	5'
	5'	AGCCAUGCUCACCUGCAU	3'
SEC ID 97			
	3'	UCGGUACGAGUUGGACGUA	5'
	5'	GCCAUGCUCACCUGCAUG	3'
SEC ID 98			
	3'	CGGUACGAGUUGGACGUAC	5'
	5'	CCUGCAUGACGGACAGAAC	3'
SEC ID 99			
	3'	GGACGUACUGCCUGUCUUG	5'
	5'	ACGGACAGCCUGAAGGAGC	3'
SEC ID 100			
	3'	UGCCUGUCGGACUUCUCG	5'
	5'	CGGACAGCCUGAAGGAGCU	3'
SEC ID 101			
	3'	GCCUGUCGGACUUCUCGA	5'
	5'	GGAGCUUGUCAACGCCAGC	3'
SEC ID 102			
	3'	CCUCGAACAGUUGCGGUCG	5'
	5'	GAAACCAAGGGCGGCCU	3'
SEC ID 103			
	3'	CUUUGGUUUCGCCCGGA	5'

SEC ID 104	5' AACCAAAGGGCGGCCUGGA 3'
	3' UUGGUUUCGCGCGGACCU 5'
	5' AACCAAAGGGCGGCCUGGAU 3'
SEC ID 105	
	3' UGGUUUCCGCGGACCUA 5'
	5' CCAAAGGGCGGCCUGGAU 3'
SEC ID 106	
	3' GGUUCCGCGGACCUAA 5'
	5' AGGGCGGCCUGGAUUCUAC 3'
SEC ID 107	
	3' UCCCGCGGACCUAAGAUG 5'
	5' GGGCGGCCUGGAUUCUACU 3'
SEC ID 108	
	3' CCGCGGACCUAAGAUGA 5'
	5' CCAGCUGGGCAUCGUGAAG 3'
SEC ID 109	
	3' GGUCACCCGAGCACUUC 5'
	5' GUUCCUGCUGCAGAACUCC 3'
SEC ID 110	
	3' CAAGGACGACGUCUUGAGG 5'
	5' CACGGCCGACAACACGAAG 3'
SEC ID 111	
	3' GUGCCGGCUGUUGUCUUC 5'
	5' CACGAAGUUUGACGAGC 3'
SEC ID 112	
	3' GUGCUUCAACACUGCUCG 5'
	5' GUUUGACGAGCAUGUAC 3'
SEC ID 113	
	3' CAAACACUGCUCGUACAUG 5'
	5' UGAGAUUCUGAUCCUGGG 3'
SEC ID 114	
	3' ACUCUAAGACUAGGACCCC 5'
	5' ACUGCACCCGACGUGAAG 3'
SEC ID 115	
	3' UGACGUGGGCUGCGACUUC 5'
	5' GCUGGAGGAGCUACCAAC 3'
SEC ID 116	
	3' CGACCUCUCGAGUGGUUG 5'
	5' CAAGAAGGAAUGACGCG 3'
SEC ID 117	
	3' GUUCUUCUUACUGCGGC 5'
	5' GAAGGAAUGACGCCGUG 3'
SEC ID 118	
	3' CUUCCUUAUCUGCGGCGAC 5'
	5' GAUCGGGUCUUGGCCUAV 3'
SEC ID 119	
	3' CUAGCCCAGAACCGGAUA 5'
	5' GUUCACCGAGUGGGCUAC 3'
SEC ID 120	
	3' CAAGUGGCUCACCCGGAUG 5'
	5' GAACUCGGUCUGGAGGUG 3'
SEC ID 121	
	3' CUUGAGCCACGACCUCCAC 5'
	5' CUCGGUCUGGAGGUGAUC 3'
SEC ID 122	
	3' GAGCCACGACCUCCACUAG 5'
	5' UCGCCACGACUUCUCUUG 3'
SEC ID 123	
	3' AGCGGUCUGUACGAGAAC 5'
	5' CCGACUCUGCAGGACAAG 3'
SEC ID 124	
	3' GGCUGAGGACGUCCUGUUC 5'
	5' GUGGGACAGAUUCGUCAAG 3'
SEC ID 125	
	3' CACCCUGUCUAAGCAGUUC 5'
	5' GCGCAUCUUCUACUUC AAC 3'
SEC ID 126	
	3' CGCGUAGAAGAUGAAGUUG 5'
	5' CUUCCUGGUCUACUGCCUG 3'
SEC ID 127	
	3' GAAGGACCAGAUGACGGAC 5'

SEC ID 128	5' GAUGGAAAAAUUGGAGAC 3'
	3' CUACCUUUUUUAACCCUCUG 5'
	5' AAAUUGGAGACUAUUUCCG 3'
SEC ID 129	
	3' UUUAACCCUCUGAUAAGGC 5'
	5' AAUUGGAGACUAUUUCCGA 3'
SEC ID 130	
	3' UUAACCCUCUGAUAAGGCU 5'
	5' AUUGGAGACUAUUUCCGAG 3'
SEC ID 131	
	3' UAACCCUCUGAUAAGGCUC 5'
	5' UUGGAGACUAUUUCCGAGU 3'
SEC ID 132	
	3' AACCCUCUGAUAAGGCUCA 5'
	5' GACCCUGUUUGUGGACAGC 3'
SEC ID 133	
	3' CUGGGACAAACACCCUGUCG 5'
	5' GGAGUAUGUGGCUCUCAUG 3'
SEC ID 134	
	3' CCUCAUACACCGAAGGUAC 5'
	5' CAUGCUCUACUACACCCGC 3'
SEC ID 135	
	3' GUACGAGAUGAUGGGGCG 5'
	5' GAUGAUCCUGAGAGACCUG 3'
SEC ID 136	
	3' CUACUAGGACUCUCUGGAC 5'
	5' GACGGGAAGAAUGACUCCC 3'
SEC ID 137	
	3' CUGCCUUCUUAACUGAGGG 5'
	5' GAAUGACUCCUGCCGUCU 3'
SEC ID 138	
	3' CUUACUGAGGGACGGCAGA 5'
	5' UGACUCCUGCCGUCUGAG 3'
SEC ID 139	
	3' ACUGAGGGACGGCAGACUC 5'
	5' CAGCCUGUACUCCACCUGC 3'
SEC ID 140	
	3' GUCGGACAUGAGGUGGACG 5'
	5' GUUCACCAUCGGCAUGGGC 3'
SEC ID 141	
	3' CAAGUGGUAGCCGUACCCG 5'
	5' CUAUGACUUCAGGCUGUC 3'
SEC ID 142	
	3' GAUACUGAAGUUCGACAG 5'
	5' GGCUGUCUUAUCAUCCUG 3'
SEC ID 143	
	3' CCGACAGAAGUAGUAGGAC 5'
	5' UUCUACCUACAUCUCCU 3'
SEC ID 144	
	3' AAGAGUGGAUGUAGGAGGA 5'
	5' CAUGCUCUACGCCUCAUG 3'
SEC ID 145	
	3' GUACGAGUAGCGGAGUAC 5'
	5' CAAGAUCCACAGGAGAGC 3'
SEC ID 146	
	3' GUUCUAGCGUGUCCUCUG 5'
	5' GAUCGCACAGGAGAGCAAG 3'
SEC ID 147	
	3' CUAGCGUGUCCUCUGUUC 5'
	5' GAACAUCUGGAGCUGCAG 3'
SEC ID 148	
	3' CUUGUAGACCUUCGACGUC 5'
	5' CAUCUGGAGCUGCAGAGA 3'
SEC ID 149	
	3' GUAGACCUUCGACGUCUCU 5'
	5' GCUGCAGAGAGCCAUCACC 3'
SEC ID 150	
	3' CGACGUCUCUGGUAGUGG 5'
	5' GAGCUCCUUAAGUGCAUG 3'
SEC ID 151	
	3' CUCGAAGGAAUUCACGUAC 5'
SEC ID 152	5' GUGCAUGAGGAGGCCUUC 3'

		3' CACGUACUCCUCCGGAAG 5'
		5' CUGGACCACCUGGAACACC 3'
SEC ID 153		3' GACCUGGUGGACCUUGUGG 5'
		5' CACCAACGUGGGCAUCAUC 3'
SEC ID 154		3' GUGGUUGCACCCGUAGUAG 5'
		5' CGUGGGCAUCAUCAACGAA 3'
SEC ID 155		3' GCACCCGUAGUAGUUGCUU 5'
		5' CGAAGACCCGGGCAACUGU 3'
SEC ID 156		3' GCUUCUGGGCCCGUUGACA 5'
		5' GCAGAGUUUCAGGCAGACA 3'
SEC ID 157		3' CGUCUCAAGUCCGUCUGU 5'
		5' GAACUUUGCCUGGUCCCC 3'
SEC ID 158		3' CUUGAAACGGGACCAGGGG 5'
		5' CUUUGCCCUGGUCCCCUU 3'
SEC ID 159		3' GAAACGGGACCAGGGGGA 5'
		5' GAGAGGCAAGUGCUCGAGA 3'
SEC ID 160		3' CUCUCCGUUCACGAGCUCU 5'
		5' GUGCUCGAGAUAGGCAGUC 3'
SEC ID 161		3' CACGAGCUCUAUCCGUCAG 5'
		5' GUUUUUCUGGCACAGUUUU 3'
SEC ID 162		3' CAAUAGACGCUGUCAAAA 5'

Figura 4



Ausencia.....0  
 Probablemente positivo.....0,5  
 Positivo pequeño .....1  
 Positivo medio .....1,5  
 Positivo moderado .....2  
 Valor intermedio.....2,5  
 Positivo severo.....3  
 Valor intermedio .....3,5  
 Extremadamente positivo.....4

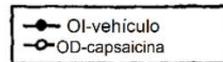


Figura 5.

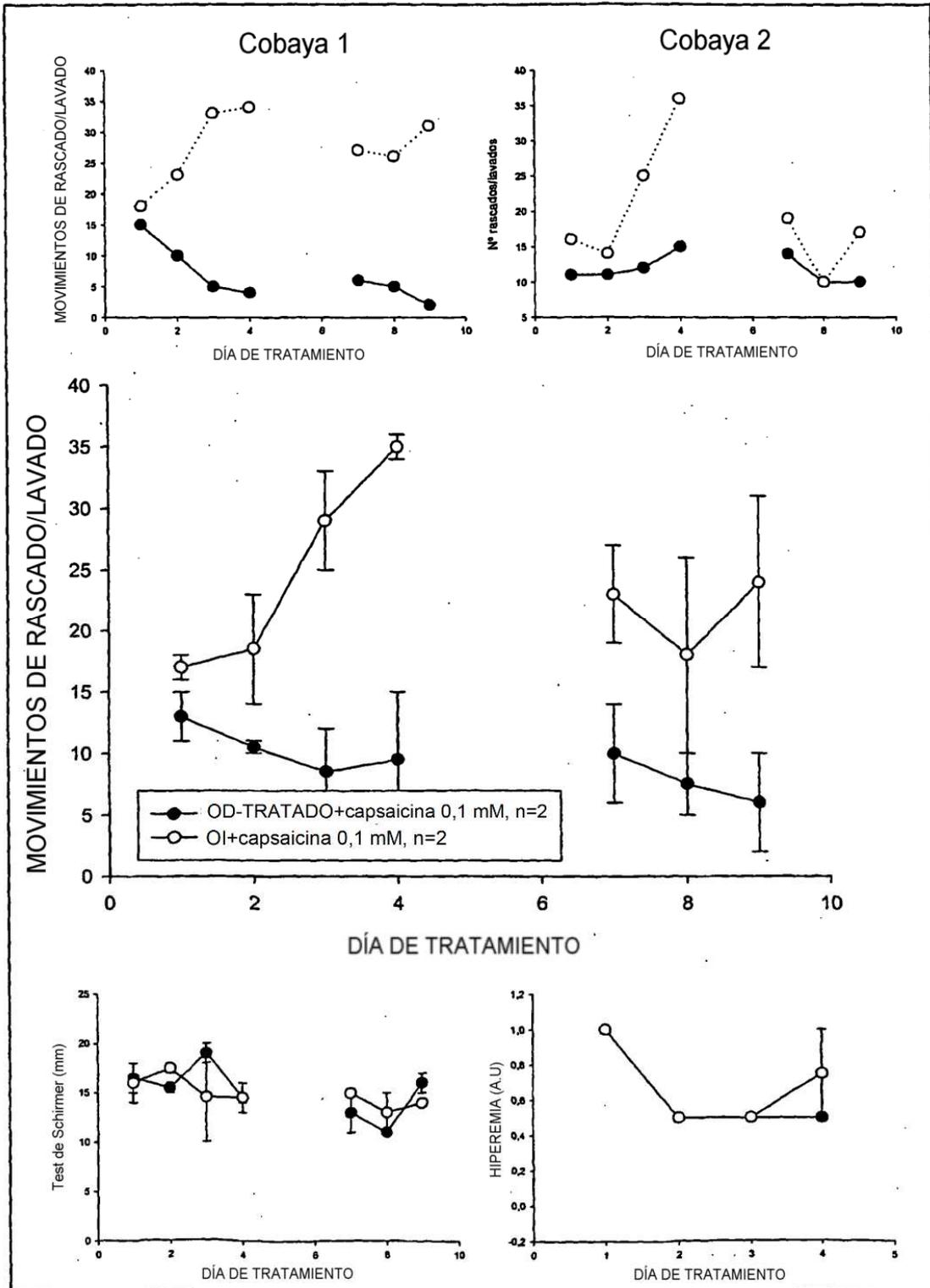


Figura 6.

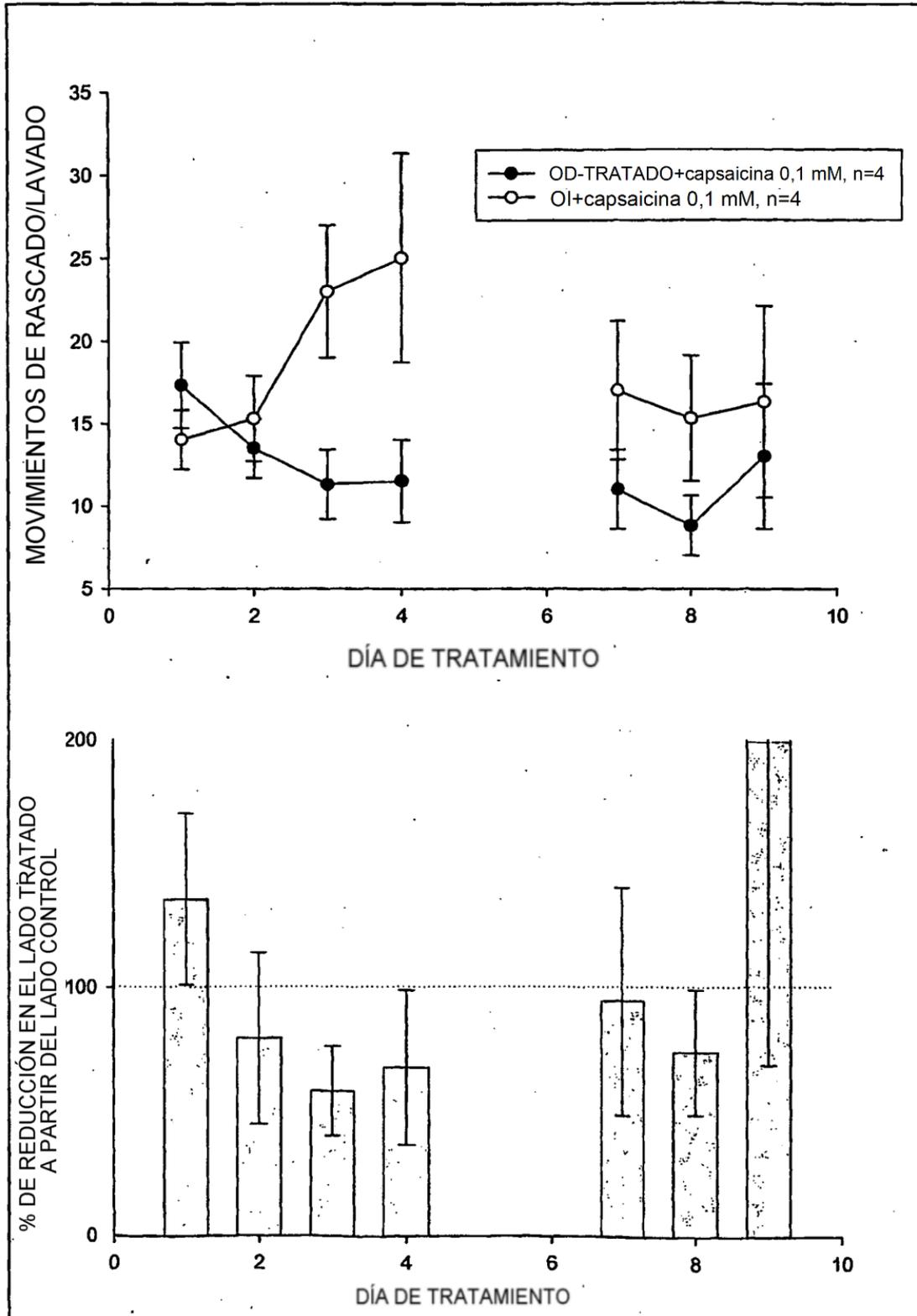


Figura 7.

**Estimulación**

- Mecánica: pelos de von Frey
- Química: pulso de CO<sub>2</sub>
- Térmica (calor): disolución a 45°C
- Capsaicina 0,1 mM

