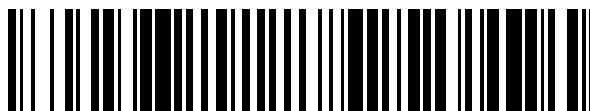


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 400 114**

51 Int. Cl.:

A61K 38/16 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

A61P 17/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.06.2009 E 09757702 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.10.2012 EP 2300043**

54 Título: **Efectos analgésicos de la toxina peptídica APETX2**

30 Prioridad:

06.06.2008 FR 0803158

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.04.2013

73 Titular/es:

**CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE - CNRS (50.0%)
3, rue Michel-Ange
75794 Paris Cedex 16, FR y
UNIVERSITÉ NICE SOPHIA ANTIPOLIS (50.0%)**

72 Inventor/es:

**DEVAL , EMMANUEL;
DIOCHOT, SYLVIE;
LAZDUNSKI, MICHEL;
LINGUEGLIA, ERIC y
NOEL, JACQUES**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO FACES, José

ES 2 400 114 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

Efectos analgésicos de la toxina peptídica APETX2

5 **Campo técnico de la invención**

10 **[0001]** La invención se refiere al uso del de la toxina peptídica de canales de cationes APETx2 inhibidora de los canales de cationes ASIC3 resultante de la anémona de mar *Anthopleura elegantissima* por sus efectos analgésicos con respecto al dolor asociado con la activación de los isoforma ASIC3 (Acid Sensing Ion Channel 3) durante la inflamación y también potencialmente en todas las situaciones dolorosas asociadas con acidosis tisular (isquemia, fracturas, hematomas, hinchazón, ampollas, infecciones locales, daño tisular, lesiones en los ojos, tumores, etc.).

Estado de la técnica anterior

15 **[0002]** La consideración y el tratamiento del dolor, incluyendo la inflamación, son esenciales para mejorar la calidad de vida de los pacientes, y se basan principalmente en la prescripción de fármacos anti-inflamatorios no esteroideos (AINE) o esteroideos. Cuando los AINE y/o corticosteroides no son suficientes para aliviar el dolor inflamatorio, el médico combina un analgésico anti-inflamatorio, por ejemplo paracetamol, con opioides débiles o fuertes. Sin embargo, a pesar de la diversidad del arsenal terapéutico existente, muchos dolores permanecen poco sensibles a medicamentos analgésicos conocidos que pueden además generar efectos secundarios no deseados, como en el caso de los AINE. En este contexto, el descubrimiento de nuevos objetivos analgésicos representaría, por lo tanto, un progreso real. Entre las dianas moleculares identificadas en los últimos años, los canales iónicos juegan un importante papel especialmente porque están directamente involucrados en la detección y transmisión de señales de dolor por fibras nociceptivas.

25 **[0003]** Los ASICs (Acid Sensing Ion Channels) son canales catiónicos activados por acidosis extracelular (para revisión, [ref. 1] y [r e f. 2]). Hasta ahora, cuatro genes que codifican al menos siete subunidades (ASIC1a, ASIC1b, ASIC1b2, ASIC2A, ASIC2B, ASIC3 y ASIC4) se han identificado en mamíferos. Los canales funcionales ASIC resultan de la combinación de diferentes subunidades de ASIC en trímeros ([ref. 3]) que conducen a canales homoméricos o heteroméricos ([ref. 4, 5 y 6]). Los canales ASIC son predominantemente canales neuronales expresadas en los sistemas nerviosos central y periférico. Mientras que los canales ASIC1a y ASIC2 están ampliamente presentes en los sistemas nerviosos central y periférico, la expresión de los canales ASIC3 y ASIC1b está restringida a las neuronas sensoriales ([ref. 7, 57 y 8]).

35 **[0004]** Se ha postulado que los ASIC son capaces de detectar la acidificación extracelular que se puede desarrollar durante la isquemia, inflamaciones, hematomas, fracturas, lesiones, cirugía (dolor postoperatorio), o el desarrollo de determinados tumores ([ref. 9]). Se sabe desde hace varios años que la acidosis extracelular genera dolor ([ref. 11 y 12]), y algunos experimentos llevados a cabo en voluntarios humanos sanos ([ref 13 y 14.]) han demostrado la implicación de los ASICs en el dolor cutáneo ácido con la ayuda de amilorida y algunos AINEs, inhibidores inespecíficos de los ASICs ([ref. 15 y 17]).

40 **[0005]** Entre todas las subunidades de ASIC que expresan las neuronas sensoriales, ASIC3 es de particular interés debido a que se expresa ampliamente en neuronas nociceptivas ([ref 7.], supra; ref [17 y 18.]), y genera una corriente no inactivante, persistente en respuesta a la acidificación moderada (hasta aproximadamente pH 7,0) ([ref. 19]). El ASIC3 actual tiene en efecto dos componentes: (1) un componente transitorio que es altamente sensible al pH (PH0, 5 = 6,5 a 6,7) ([ref 7.], supra; [ref 20.]) rápidamente activante (t0.5 <5 ms) e inactivante (t0.5 = 0,32 s) ([ref. 20], supra), y (2) un componente sostenido que resulta de la acidificación moderada (pH entre 7,3 y 6,7) de la corriente de ventana a partir de la superposición parcial de las curvas de activación e inactivación del canal ([ref. 19], supra) y para pHs más ácidos (pH <6,0) de un mecanismo aparentemente diferente. La corriente transitoria se recupera rápidamente después de la inactivación después de un retorno a pH neutro (t0.5 = 0,58 s) ([ref. 20], supra). Para la comparación, ASIC1a requiere un tiempo de recuperación mucho más largo (t0.5 = 13s) ([ref. 20], supra). La corriente transitoria se inactiva rápidamente cuando el pH de reposo es ácido. Por el contrario, la corriente sostenida todavía puede activarse cuando el pH disminuye partir de un pH de reposo relativamente ácido (<pH 6) y también se activa cuando el pH extracelular disminuye gradualmente ([ref. 7], supra). Estudios recientes en ratones knockout sugieren una función de ASIC3 en la detección de la acidosis tisular en los músculos y articulaciones en modelos de hiperalgesia mecánica secundaria inducida por inflamación o por inyecciones repetidas de ácido en el músculo ([ref. 21, 22, 23 y 60]). La participación de ASIC3 en la mecano sensibilidad de las neuronas sensoriales de gran también se ha postulado ([ref. 21]). Sin embargo, la comparación de los ratones normales y ratones knockout no mostraron una importante función de ASIC3 en el dolor cutáneo ácido o hipersensibilidad cutánea al dolor asociado con la inflamación ([ref. 21] y sobre [ref. 25]).

60 **[0006]** Además, si los estudios pueden en el mejor de los casos predecir que la inhibición de la actividad de ASIC3 podría *a priori* afectar al dolor, la implicación real de los ASIC y la contribución relativa de las diferentes isoformas presentes en las neuronas sensoriales , especialmente ASIC3, en la sensibilidad *en vivo* de los nociceptores al ácido y en el dolor cutáneo ácido en condiciones normales o inflamatorias aún no se han demostrado. Además, tampoco se ha demostrado cómo podría afectar el dolor la hiperalgesia, analgesia y la inhibición de la actividad de los ASIC,

especialmente ASIC3. Sin embargo, los análisis adicionales requeridos necesitan de herramientas farmacológicas selectivas.

5 [0007] Hasta hace poco tiempo, el repertorio de ligandos activos capaces de inhibir ASIC3 se limitaba principalmente a amilorida y fármacos anti-inflamatorios no esteroideos (AINEs) ([ref. 7] supra y [ref. 17] , supra). Sin embargo, ninguno de estos fármacos es absolutamente específicos de los canales ASIC o un tipo particular de canal ASIC, y, especialmente, ASIC3.

10 [0008] Durante muchos años, los venenos de animales han producido un gran número de toxinas que pueden modular específicamente con alta afinidad las corrientes Ca^{2+} , K^{+} y Na^{+} dependientes de voltaje ([ref. 28, 29, 30, 31, 32 , 33]), el canal de potasio dependiente de Ca^{2+} ([ref. 34 y 35]), y los canales de potasio mecanosensibles ([ref. 58]). Recientemente, se identificaron dos toxinas animales (PcTx1 y APETx2) capaces de bloquear específicamente canales ASIC1A ([ref. 36]) y ASIC3 ([ref. 38]), respectivamente.

15 [0009] Con el fin de identificar efectores específicos del canal ASIC3, un gran número de venenos de escorpión, abeja, araña, serpiente y anémona de mar (dilución 1/1000) o fracciones de péptidos (0,1 mg/ml) se han cribado en relación a los canales ASIC3 expresados en ovocitos de *Xenopus*. Se ha demostrado que una fracción peptídica de la anémona de mar *Anthopleura elegantissima* inhibe más del 80% de la corriente de ASIC3 en rata estimulada a pH 6. El péptido activo se purificó hasta homogeneidad por cromatografía en fase inversa y de intercambio catiónico seguido de un recorrido por las fracciones activas de ASIC3, y se denominó APETx2 ([ref. 38]).

25 [0010] APETx2 es un péptido de 42 aminoácidos con tres puentes disulfuros, con una organización estructural similar a otras toxinas de anémona de mar que bloquean los canales de potasio y de sodio sensibles al voltaje. Su secuencia completa se determinó por degradación N-terminal de Edman, y su masa monoisotópica medida (4557,96 Da) está en buen acuerdo con la masa calculada a partir de los datos de secuencia (4557,88 Da, precisión 17 5 ppm), que indica una extremidad C- terminal libre. APETx2 tiene un 64% de identidad (76% de homología) con la secuencia APETx1 ([ref. 40]) y sólo el 34% de identidad de secuencia (57 y 55% de homología, respectivamente) con las toxinas BDS- 1 y BDS-II de *Anemonia sulcata*, que inhiben la corriente de potasio Kv3.4 dependiente de voltaje ([ref. 41]). La identidad de secuencia con péptidos activadores de las corrientes de sodio, tales como AP-A, B-AP, AP-C, 1-APE1, APE-2 sp de *Anthopleura*. ([Ref. 39]) es sólo del 25-29% (41-47% de homología). Además, APETx2 no tiene ninguna homología de secuencia con PcTx1, el inhibidor específico de la isoforma ASIC1a ([ref. 36], supra).

35 [0011] APETx2 bloquea directamente ASIC3 actuando en su parte exterior, y no altera la conductancia unitaria del canal. APETx2 bloquea de manera reversible ASIC3 inhibiendo la corriente transitoria ($IC_{50} = 63$ nM) sin afectar a la corriente sostenida, pero no tiene efecto sobre las isoformas ASIC1A, ASIC2A y ASIC1b. APETx2 inhibiendo también el flujo de heteromero ASIC2B 3, mientras que tiene menos afinidad por heteromero ASIC1a ASIC1b 3 y 3, y ningún efecto sobre el heteromero ASIC2A 3 ([ref. 38] , supra).

40 [0012] Sorprendentemente, los inventores han demostrado que la inyección periférica, especialmente la subcutánea, de la toxina peptídica APETx2 reduce el dolor (efecto analgésico) asociado con la activación de la isoforma ASIC3 en modelos de dolor en ratas ligado a la inflamación y a la inyección subcutánea de las soluciones de ácido que imitan todas las situaciones dolorosas asociados con la acidosis tisular (isquemias, fracturas, lesiones de tejidos, tumores, etc ...).

45 Descripción de la invención

50 [0013] La invención pretende superar los inconvenientes de la técnica anterior, y especialmente para adaptar nuevas moléculas analgésicas específicas del objetivo, con efectos secundarios pequeños o no adversos, y fáciles de usar, incluyendo dispositivo de aplicación (subcutáneo, intramuscular, transdérmico, cutáneo, etc ...).

55 [0014] La invención se refiere a la toxina peptídica APETx2 de la anémona de mar *Anthopleura elegantissima*, péptidos aislados de otros venenos de la anémona de mar y otras especies marinas de la misma familia con 60 a de 99% identidad de secuencia con la secuencia de 42 aminoácidos de la toxina peptídica APETx2, y péptidos aislados del veneno de la anémona de mar *Anthopleura elegantissima* que tiene (i) al menos una sustitución en las posiciones 3, 5, 8, 9, 10, 15-17, 23, 31-33, 36, 39 y 41 o (ii) una extensión de al menos un aminoácido en el extremo N-y /o C-terminales de la secuencia de 42 aminoácidos de la toxina peptídica APETx2, para su uso como analgésico. Dichos péptidos retienen la propiedad de la toxina péptido para inhibir los canales de tipo APETx2 ASIC3.

60 [0015] Se entiende por "análogos de la toxina peptídica APETx2" péptidos aislados de otros venenos de la anémona de mar y otras especies marinas de la misma familia y ASIC3 con el mismo tipo propiedad inhibición del canal . Por ejemplo, hay péptidos que tienen de 60 a 99% de identidad de secuencia con la secuencia de 42 aminoácidos de la toxina APETx2 péptido.

65

[0016] El término "derivado de la toxina péptido APETx2", péptidos aislados de la misma veneno tiene una delección y / o extensión y / o sustitución de uno o más aminoácidos en la secuencia de 42 aminoácidos de APETx2 péptido toxinas, y que presentan la misma propiedad de inhibición que los canales de tipo ASIC3. Por ejemplo, puede ser de péptidos variantes que tienen una sustitución en las posiciones 3, 5, 8, 9, 10, 15, 16, 17, 23, 31, 32, 33, 36, 39 y / o 41 en la secuencia de 42 aminoácidos de la toxina peptídica APETx2. También puede incluir variantes de péptidos que tienen una extensión de uno o más aminoácidos en las extremidades N-y/o C-terminales de la secuencia de la toxina peptídica APETx2.

[0017] Según una realización particular de la invención, el medicamento está previsto para prevenir o tratar enfermedades que implican canales de tipo ASIC3. Por ejemplo, las condiciones patológicas se seleccionan del grupo que constituido por las inflamaciones, incluyendo gastritis, isquemia (musculares, de corazón, mesentéricas ...), fracturas, contusiones, hinchazón, formación de ampollas, infecciones locales, daños en los tejidos incluyendo incisiones relacionadas con un procedimiento quirúrgico, lesiones oculares, prurito y tumores incluyendo tumores y metástasis óseas.

[0018] Dicho fármaco es un analgésico, preferentemente para la prevención o el tratamiento del dolor inducido por activación de los canales de tipo ASIC3, más preferiblemente para la prevención o el tratamiento del dolor resultante de la inflamación.

[0019] En otra realización particular de la invención, dicho analgésico está destinado a la prevención o el tratamiento del dolor asociado con la activación del ácido de canales de tipo ASIC3. Por ejemplo, situaciones dolorosas asociadas con la acidosis tisular que se seleccionan del grupo constituido por isquemias (musculares, de corazón, mesentéricas, ...), fracturas, contusiones, hinchazón, formación de ampollas, infecciones locales, lesiones en los tejidos incluyendo incisiones relacionadas con un procedimiento quirúrgico (dolor postoperatorio), lesiones oculares, y en tumores (incluyendo tumores y metástasis óseas).

[0020] De acuerdo con otra realización de la invención, dicho analgésico está destinado a la prevención o el tratamiento del pruritos, en la medida en que estos proceden de un proceso patológico que involucra diferentes vías sensoriales similares ([ref. 61]) de las del dolor asociado con la activación de los canales de tipo ASIC3.

[0021] Según una realización particular de la invención, dicho medicamento se administra de manera periférica, por ejemplo, subcutánea, intramuscular, transdérmica o cutánea. Preferiblemente, dicho medicamento se administra por vía subcutánea.

Breve descripción de las figuras

[0022] Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la lectura de la descripción que se muestra a continuación, con referencia a las figuras anexas:

La Figura 1 es una imagen en fluorescencia de una neurona cutánea de ganglios raquídeos marcada de manera retrógrada y corrientes ASIC registradas en estas neuronas;

La Figura 2 muestra el efecto de la presión osmótica (hipertonicidad) y ácido araquidónico sobre la corriente inducida por el pH nativo ASIC 7,0;

La Figura 3 muestra la potenciación por hipertonicidad de las corrientes ASIC1a y ASIC3 recombinantes inducidas por acidificación moderada;

La Figura 4 muestra el aumento en la corriente de ventana ASIC3 no inactivante por el mediador inflamatorio, el ácido araquidónico (AA) y el efecto sinérgico sobre la corriente de ácido araquidónico y la hipertonicidad durante la acidosis moderada.

La Figura 5 muestra el papel in vivo de ASIC3 en el dolor cutáneo ácido, su modulación positiva por factores inflamatorios (ácido araquidónico e hipertonicidad) y su papel en la hiperalgesia térmica inflamatoria.

La Figura 6 muestra el efecto específico de la inyección intratecal de un RNA de interferencia dirigido contra los el ARN mensajero de ASIC3 sobre los niveles en ganglios raquídeos de los ARN mensajeros de canales ASIC y del canal TRPV1, y el efecto analgésico de este RNA de interferencia en un modelo de dolor inflamatorio.

La Figura 7 muestra el efecto de la toxina APETx2 sobre la actividad de los canales ASIC3 humanos expresados en la línea de neuronas sensoriales F11.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: material y método

Purificación de la toxina peptídica APETx2 de la anémona de mar *Anthopleura elegantissima*

[0023] Un grupo de polipéptidos se aisló a partir de un extracto alcohólico (agua-metanol) bruto de anémona de mar *Anthopleura elegantissima* ([ref. 39], supra) por cromatografía de intercambio catiónico sobre QAE-Sephadex A-25 (4,5 x 400 nm), eluyendo con acetato de amonio (pH 8,3), seguido por cromatografía de permeación de gel en Sephadex G50 (12x140 cm) en ácido acético 1M.

5 **[0024]** Seis fracciones se ensayaron en los canales ASIC3 expresados en ovocitos de *Xenopus* ([ref. 41], supra). Una fracción, habiendo inhibido más de un 80% de corriente ASIC3, se purificó por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) para invertir la fase (Waters Symmetry C18, 4,6 x 250 mm) con un gradiente lineal de 10 a 40% de disolvente B (acetonitrilo / TFA 0,1%) durante 30 min, a 1 ml / min.: La separación se realizó en un sistema HP1100 (Hewlett Packard, EE.UU.) acoplado a un detector de red de diodos con un control de absorbencia de UV a 220 y 280 nm.

10 **[0025]** La fracción de péptido activo se purificó en una columna de intercambio catiónico TSK-SP5PW (7,5 x75 mm) (Tosoh, Japón) equilibrada con una mezcla de agua/ácido acético al 1% usando un gradiente lineal de 0 a 100% acetato de amonio 1 M durante 50 min. a 1 ml/min. La purificación final de APETx2 se realizó en la misma columna HPLC de polaridad de fase inversa en, usando un gradiente lineal de 20 a 30%, durante 10 min. Seguido de 30-40% de disolvente B durante 20 min.

15 **[0026]** La secuencia de la toxina peptídica APETx2 se realizó por secuenciación N-terminal de Edman automatizada (477A, Applied Biosystems, EE.UU.) después de la reducción con 2-mercaptoetanol y alquilación con 4-vinilpiridina. La secuencia C-terminal del péptido se confirmó por citraconylation de residuos arginina, seguida de digestión con tripsina. Los fragmentos tripticos se separaron por HPLC (Waters C18, 2x150 mm) utilizando un gradiente lineal de acetoneitrilo al 5-50% / 0,1% de TFA en agua / 0,1% TFA durante 40 min., a 200 μ l/min. Las homologías de secuencia se determinaron utilizando el programa BLAST. La determinación del peso molecular se llevó a cabo por MALDI-TOF en un Voyager DE-PRO (Applied Biosystems, EE.UU.) en un modo reflector, con una matriz de ácido α -ciano-4-hidroxicinámico (Sigma- Aldrich, EE.UU.) y una calibración interna. El espectro de masa se analizó con el software Data Explorer, y pesos moleculares teóricos se calcularon a partir de los datos de secuencia utilizando el software GPMW.

25 **[0027]** La disposición del enlace disulfuro de la toxina peptídica APETx2 se determinó mediante el método de reducción parcial y la escisión inducida por cianilación ([ref. 42 y 56]).

30 **[0028]** Un modelo molecular de la toxina peptídica APETx2 se calculó a partir de los datos de APETx1 descritos previamente ([ref. 40], supra) usando el software Deep-View-Swiss-PDB viewer v3.7. Este modelo se ha optimizado a través del servidor Swiss-Model. Los datos BDS-I (1BDS) se obtuvieron de la base de datos PDB. Finalmente, la estructura espacial de la toxina peptídica APETx2 se estableció por resonancia magnética nuclear, y es esencialmente un núcleo compacto unido por puentes disulfuros compuesto de una lámina β de cuatro hebras ([ref. 43]).

35 Cultivo de la línea celular F-11y transfección

40 **[0029]** La línea celular F-11 (ref. 44, 45, 46, 47) se cultivó en 5% de CO₂ a una densidad de 50.000 células por placa de Petri de 35 mm de diámetro. El medio de cultivo contenía medio HAM F-12 (Invitrogen) suplementado con 15% de suero bovino fetal (ICN Biomedicals), 1 x HAT (hipoxantina de sodio, aminopterina y timidina), 200 μ g/ml de allo-4-hidroxi-L-prolina (Sigma-Aldrich), y 1% de antibióticos. Un día después del esparcimiento, las células fueron transfectadas con ADNc de ASIC1a o ASIC3 (clones de rata) usando Lipofectamine™ (Invitrogen) según las instrucciones del fabricante, utilizando vectores pCI-ASIC1ar + pIRES2-EGFP (relación 1: 2) o pCI-ASIC3r + pIRES2-EGFP (relación de 1: 10) ([36 ref.], supra). Para los experimentos en relación al clon humano ASIC3 (véase experimentos sobre los efectos de la toxina en la forma humana APETx2 canal ASIC3), las células fueron transfectadas con el ADNc de ASIC3 humano utilizando el agente de transfección jetPEI (Polyplus-transfection) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, utilizando el vector pASIC3h-IRES-EGFP. Las células fueron utilizadas para experimentos de Patch-clamp (técnicas de registro electrofisiológico de corrientes iónicas que pasan a través de las membranas celulares) 2-4 días después de la transfección.

50 Marcado retrógrado de aferentes cutáneos

55 **[0030]** Las neuronas del ganglio de la raíz dorsal (ganglios raquídeos o DRG) que inervan la piel se marcaron por inyecciones subcutáneas de 5 x 1 μ l de colorante fluorescente Dil (5% de DMSO, Molecular Probes) en las superficies dorsales de las patas traseras de la rata. El medio de contraste se inyectó dos semanas antes de sacrificar a las ratas para lograr un cultivo primario de ganglio de raíz dorsal.

Cultivo primario de neuronas de ganglios de la raíz dorsal marcados

60 **[0031]** Los ganglios de la raíz dorsal lumbar L3-L6 de ratas Wistar (8-11 semanas) se disecaron de manera bilateral y se disociaron enzimáticamente con colagenasa al 0,1%. Las células se sembraron en placas de Petri recubiertas con colágeno de 35 mm de diámetro y se mantuvieron en cultivo a 37 °C (95% de aire / 5% CO₂) en un medio DMEM que contenía 5% de suero fetal bovina. Los experimentos electrofisiológicos se realizaron 1-8 días después del esparcimiento.

Electrofisiología

5 **[0032]** La configuración de célula completa de la técnica de patch-clamp se utilizó ([ref. 48]) para medir corrientes de membrana (voltaje impuesto) o potenciales de membrana (corriente impuesta). Los registros se realizaron a temperatura ambiente usando un amplificador RK-400 (Bio-Logic Science Instruments) con un filtro de paso bajo de 3 kHz (Krohn-Hite). Los datos fueron muestreados a 10 kHz, digitalizados con Digidata 1322A convertidor A-D/D-A (Axon Instruments) y se almacenaron en un disco duro usando software pClamp (versión 9.2.0.11, Axon Instruments). Las pipetas de registro (1-4 MOhm) contenían (en mM): 135 KCl, 2,5 Na₂-ATP, 2 MgCl₂, 2.1CaCl₂, 5 EGTA, 10 HEPES (pH 7,25 con KOH). Varias soluciones de tampón y fármacos de interés se aplicaron a las células transfectadas individualmente usando un sistema de microperfusión localmente desarrollado y controlada por válvulas de solenoide (micro Sirai, Italia) para cambios rápidos en la solución. La solución del baño de control contenía (en mM): 145 NaCl, 5 KCl, 2 MgCl₂, 2 CaCl₂, 10 HEPES (pH 7,4 con NaOH). El medio MES se utilizó en lugar de HEPES para tamponar la solución a un pH que varía de 6 a 5, y las corrientes ASIC fueron inducidas por cambio rápido de solución de control de a pH 7,4 solución de prueba de ácido utilizando el sistema de microperfusión. Para los experimentos realizados en las neuronas DRG, se añadió glucosa (10 mM) a la solución del baño de control. Se obtuvieron condiciones hipertónicas mediante la adición de manitol o sacarosa a soluciones de baños externos, como se indica en el texto.

Comportamiento nociceptivo en ratas

20 **[0033]** Ratas Wistar adultas macho (7-8 semanas) (Charles River, Francia) se colocaron en jaulas de plástico con nycthemeron de 12h (con luz de 8:00 a 20:00) y el acceso ad libitum a alimento y agua. Las ratas se aclimataron durante al menos 1 semana antes de los experimentos. Para los experimentos de comportamiento, las ratas se colocaron en una cámara de observación transparente en la que se aclimataron durante 20-30 minutos. Se inmovilizaron entonces mientras que 20 µl de solución salina (0,9% o 2% de NaCl + 20 mM de HEPES, 7,4 ≤ pH ≤ 6,6 suplementado o no con ácido 10 microM. araquidónico y / o 10 µM de toxina APETx2 o 60 nM de toxina PcTx1) se administró por vía subcutánea en la superficie dorsal de la pata trasera derecha usando una aguja de calibre 30G conectada a una jeringa Hamilton de 100 µl. El comportamiento nociceptivo (es decir, el número de temblores de la pata) se registró durante un período de 5 minutos comenzando inmediatamente después de la inyección ([ref 59.]):

Hiperalgnesia térmica inducida por la inflamación en ratas

35 **[0034]** La sensibilidad al calor de ratas Wistar macho adultas (Charles River, Francia), se probó midiendo el tiempo tomado por el animal para levantar una pata trasera cuando se coloca sobre una placa a 50 °C (Bioseb, Francia) antes y después de la inducción de la inflamación por inyección subcutánea de una solución de adyuvante completo de Freund (CFA, Sigma-Aldrich, Francia). Las ratas se aclimataron a la sala de ensayo durante al menos 30 minutos, y cada medición se realizó por duplicado. La primera medición se realizó antes de la inducción de la inflamación. Las ratas fueron anestesiadas (isoflurano), mientras que 150 µl de CFA diluido 1: 1 con solución salina (0,9% NaCl) que contenía o toxinas (PcTx1 o APETx2, 120 nM y 20 µM, respectivamente) o el vehículo fueron inyectados (aguja de calibre 26G conectada a una jeringa de 1 ml) por vía subcutánea en la superficie plantar de una pata trasera. El tiempo tomado por el animal para quitar la pata inyectada trasera se midió a 50 °C, 2, 4 y 24 horas después de la inyección de CFA.

Inyecciones intratecales de ARN de interferencia en ratas

45 **[0035]** Un ARNi específico de los canales ASIC3 (no.1121; CTACACGCTATGCCAAGGA, SEQ ID NO: 1) y su control (no.1121 S; GCTCACACTACGCAGAGAT, SEQ ID NO: 2) se diseñaron y sintetizaron en el laboratorio por la empresa MWG Biotech (Alemania). El ARNi específico ASIC3 se validó mediante la cuantificación de los niveles de ARN mensajeros por RT-PCR cuantitativo para los diferentes canales ASIC y el canal TRPV1 después de inyecciones intratecales en ratas en la región lumbar de la médula espinal, o modo de una inyección por día durante 3 días consecutivos antes del sacrificio del animal. El mismo procedimiento se utilizó antes de la inducción de la inflamación por CFA. Cada inyección corresponde a un volumen de 10 µl que contiene 2 µg de RNA mezclado con el agente de transfección i-Fect (Neuromics) en una proporción de 1 por 4.

Productos químicos

55 **[0036]** La medios HEPES (ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico) y MES (2-(N-morfolino)etanosulfónico; C₆H₁₃NO₄S • H₂O), manitol, capsazepina, el ácido araquidónico se adquirió de Sigma.

Análisis de los datos

60 **[0037]** Los análisis de datos se realizaron utilizando los softwares Microcal™ Origin ® 6.0 y GraphPad Prism 4.03. Los datos se representaron como media ± error estándar de la media, y diferencias estadísticas entre grupos de datos se evaluaron usando la prueba t de Student o el análisis de una vía de la varianza unidireccional (one way ANOVA), seguido de las pruebas post hoc cuando sean necesarios.

Ejemplo 2: Corrientes de tipo ASIC3 en las neuronas de ganglios raquídeos que inervan la piel

5 [0038] Las corrientes ASIC activadas por acidificaciones extracelulares moderadas se registraron en neuronas de ganglios raquídeos que inervan la piel en ratas e identificados por marcado retrógrado con el colorante fluorescente Dil (Figura 1).

10 [0039] Los valores de pH moderados que se utilizan en estos experimentos (es decir, pH 6,6 y pH 7,0) fueron elegidos para activar principalmente corrientes de tipo ASIC1 y ASIC3, ya que las corrientes de tipo ASIC2 y TRPV1 se han descrito como activadas por una acidificación más drástica ([ref. 49] y [ref. 2], supra).

15 [0040] La figura 1A muestra una neurona cutánea de ganglios raquídeos positiva al Dil típico (cf .flecha) que se utiliza para los experimentos patch clamp en configuración de célula completa. Estas neuronas tienen un potencial de membrana de reposo de $-55,0 \pm 1,8$ mV y una capacidad de membrana de $39,6 \pm 1,8$ pF (n = 42 y 43 neuronas, respectivamente, datos procedentes de cuatro cultivos diferentes).

20 [0041] La Figura 1B muestra que el $65,8 \pm 6,3\%$ de las neuronas cutáneas de ganglios raquídeos probados (4/7, 8/11, 8/10 y 8/15, datos procedentes de cuatro cultivos diferentes) tienen una corriente ASIC transitoria inducida por el pH 6,6 con una amplitud media de $-60,3 \pm 16,0$ pA/pF (n = 28). Entre las neuronas cutáneas de los ganglios raquídeos restantes ($34,2 \pm 6,3\%$) la aplicación externa de un pH 6,6, inducido sea de ninguna corriente (n = 11) o sólo de una pequeña corriente sostenida ($-1,2 \pm 0,5$ pA / pF, n = 4).

25 [0042] Con el fin de distinguir entre las corrientes inducidas por el ASIC pH 6,6 en las neuronas cutáneas de ganglios raquídeos, la toxina PcTx1 específica de ASIC1a se utilizó ([ref. 36], supra), un inhibidor selectivo de canales homómeros ASIC1a.

30 [0043] La Figura 1B (panel derecho) muestra que 4,7% (2/43) de estas neuronas muestran una gran corriente inhibida por la toxina (inhibición > 90%, es decir, la corriente homómera ASIC1a), 23,3% (10/43) muestra la corriente insensible a la toxina (inhibición <10%, es decir, corriente de tipo ASIC3) y 37,2% (16/43) presentan corrientes parcialmente inhibidas ($10\% \leq \text{inhibición} \leq 90\%$, es decir, corrientes de mezcla y homómera ASIC3 tipo ASIC1A). La figura 1C confirma la participación de ASIC3 en estas corrientes debido a su sensibilidad a la toxina peptídica parcial APETx2, que bloquea específicamente los canales que contienen la isoforma ASIC3 ([ref: 38], supra).

35 [0044] Además, el uso de la acidificación moderada (pH 6,6) para inducir las corrientes ASIC en las neuronas cutáneas de ganglios raquídeos ha permitido descartar la mayoría, si no toda la corriente tipo ASIC2A y TRPV1. La corriente ASIC más abundante activada por acidificación moderada en las neuronas cutáneas de ganglios raquídeos fue, de ese modo, fue la corriente de tipo ASIC3 con una puntuación de 60,5% (26/43).

Ejemplo 3: Potenciación por dos estímulos inflamatorios, la presión osmótica y el ácido araquidónico, de corriente ASIC de neuronas cutáneas de ganglios raquídeos activados por acidificación moderada

45 [0045] En los tejidos dañados o inflamados, varios mediadores potenciales se encuentran en el líquido intersticial y forman un exudado inflamatorio ([ref. 50]), cuyo contenido es ácido y hiperosmótico ([ref. 51]). De ese modo, el efecto de la hiperosmolaridad de las neuronas ASIC cutáneas corrientes de ganglios raquídeos activados por acidificación moderada ha sido estudiado.

50 [0046] Las Figuras 2A, 2D y 2E muestran que la hiperosmolaridad, co-aplicada con acidificación moderada externa (pH 7,0, cf. flechas en la figura 2E), es capaz de aumentar significativamente la corriente de tipo ASIC inducida por pH 7,0 en estas neuronas (aumento del $95\% \pm 35\%$, n = 8, P <0,01, test t de Student por pares) que conducen a un aumento en la excitabilidad neuronal causando más potenciales de acción (Figura 2B).

55 [0047] Un efecto positivo del mediador de inflamación, el ácido araquidónico (AA) en corrientes ASIC ya ha sido descrito ([ref. 52 y 53]). Este efecto fue confirmado en la corriente ASIC inducida por el pH 7,0 nativo a partir de neuronas cutáneas de ganglios raquídeos (Fig. 2D, aumentó en un $172 \pm 65\%$, n = 6, P = 0,06, prueba t de Student por pares). Significativamente, la figura 2C muestra que el efecto del ácido araquidónico también ha dado lugar a un aumento de la excitabilidad de las neuronas cutáneas de ganglios raquídeos por aumento de la liberación del potencial de acción.

60 [0048] Las cinéticas de estos dos efectos son diferentes. En efecto, la figura 2E muestra que mientras que la potenciación inducida por la hiperosmolaridad de la corriente ASIC nativa es inmediata (co-aplicación con el salto de pH), el efecto del ácido araquidónico en las corrientes de ASIC necesita unos minutos para estar en pleno funcionamiento. Además, las aplicaciones repetidas de la hiperosmolaridad en la misma célula conducen a una reducción del efecto (cf. flechas), mientras que el efecto del ácido araquidónico aumenta hasta un máximo, siempre y cuando se aplique a una célula (caja gris). Por lo tanto, en conjunto, estos resultados muestran que (i) las corrientes ASIC activadas por acidificación moderada (pH 7,0) en las neuronas cutáneas de los ganglios de la raquídeos son lo suficientemente grandes como para llevar al potencial de membrana umbral de activación de los

potenciales de acción, (ii) dos señales inflamatorias tales como el ácido araquidónico y la hipertonicidad aumentan la excitabilidad neuronal a través de un efecto potenciador sobre la corriente ASIC activada por acidificación moderada.

5 **Ejemplo 4: sensibilidad del canal ASIC3 recombinante a la presión osmótica en las células F-11 derivadas de ganglios raquídeos**

10 **[0049]** Con el fin de analizar con mayor precisión el efecto de la presión osmótica en las diferentes isoformas de ASIC, los canales ASIC1a y ASIC3 se expresaron heterológicamente en la línea celular F-11 ([ref. 44, 45, 46, 47], supra).

15 **[0050]** Los canales ASIC1a y ASIC3 se utilizaron ya que (i) son representativos de las corrientes ASIC expresadas en las neuronas de ganglios de raquídeos de rata (ref 54) [ref. 55], supra) (véase también la Figura 1), y (ii) su pH liminal para la activación está cerca de pH 7,0 ([ref. 2], supra).

20 **[0051]** La Figura 3A muestra que la hiperosmolaridad (600 mosmol.kg⁻¹ con manitol) es capaz de potenciar significativamente la corriente ASIC3 activada por el pH 7,2 (aumento de 148 ± 20%, n = 20, P < 0,001, prueba t de Student por pares). En contraste, la acidificación externa a pH 7,2 no produjo ninguna corriente ASIC1a significativa a partir de células transfectadas con ASIC1a y la hiperosmolaridad no tiene ningún efecto. La figura 3B muestra de forma interesante que la hiperosmolaridad (600 mosmol.kg⁻¹), que todavía no tiene efecto en la corriente ASIC1a activada por pH 6,6, no pudo potenciar la corriente ASIC3 activada por el pH 6,6 , lo que sugiere un efecto sobre la corriente de ventana ASIC3 no inactivante, persistente ([ref. 19], supra).

25 **[0052]** Para confirmar que los choques hiperosmóticos potencian la corriente ASIC3, las curvas I/V de la corriente inducida por el pH 7,2 registrada a partir de células 11 F transfectadas fueron establecidas a continuación (Fig. 3C, panel superior). Las corrientes inducidas por el pH 7,2 controla (medida en condiciones isotónicas) y aumenta (medida en condiciones hipertónicas) tienen el mismo potencial de inversión (49,4 ± 0,7 mV y 45,9 ± 3,4 mV, respectivamente , P = 0,48, prueba t de Student por pares) (Figura 3C, panel inferior), lo que indica que la hiperosmolaridad realmente potencia la corriente ASIC3.

30 **[0053]** La Figura 3D muestra que el porcentaje de aumento de corriente ASIC3 inducida por el pH 7,2 es casi máximo cuando la osmolaridad externa alcanza 600 mosmol.kg⁻¹. Además, la hipertonicidad es el factor principal en este sentido ya que se observa también, aunque en amplitud ligeramente inferior, cuando las soluciones hiperosmóticas externas se han hecho con sacarosa (Fig. 3D).

35 **[0054]** Estos resultados indican que la hiperosmolaridad potencia la corriente ASIC3 en una amplitud de pH moderada (es decir, cerca de pH 7,2), probablemente a través de un efecto sobre la corriente de ventana ASIC3.

Ejemplo 5: Potenciación de la corriente de ventana ASIC3 no inactivante por ácido araquidónico

40 **[0055]** El efecto del ácido araquidónico (AA) se analizó para células F-11 transfectadas con ASIC1a y ASIC3 para examinar el efecto potenciador del ácido araquidónico (AA) en las corrientes de ASIC .

45 **[0056]** Un efecto del ácido araquidónico en la actividad de los canales ASIC ya se ha descrito ([ref. 52] y [Ref. 53]supra), pero el mecanismo del efecto sigue siendo poco conocido.

50 **[0057]** La Figura 4A muestra que el ácido araquidónico produce un aumento reversible drásticamente de la corriente ASIC3 activada por el pH 7,2 mientras que no tiene ningún efecto sobre ASIC1a al mismo pH. El ácido araquidónico potencia fuertemente las corrientes ASIC3 activadas por el pH 7,2 y pH 7,0 (aumento del 547 ± 103%. P <0,0001, n = 23 y 493 ± 84%, p <0,0001, n = 9, respectivamente, prueba de Wilcoxon), mientras que la corriente de ASIC3 activada por el pH 6,6 es sólo ligeramente mayor (40 ± 22%, n = 7, p = 0,45, prueba t de Student por pares) (cf. Figura 4B). De acuerdo a los resultados anteriores ([ref. 53], supra), el ácido araquidónico también aumenta la corriente ASIC1a a pH 7,0 (183 ± 54%, n = 5, P = 0,06, prueba Wilcoxon) y en menor medida a pH 6,6 (21 ± 15%, n = 2), pero este efecto es mucho menor que para ASIC3 (Fig. 4B).

55 **[0058]** La Figura 4C muestra el efecto potente de ácido araquidónico en la corriente ASIC3 resultante de un cambio en la dependencia del pH de activación a valores más fisiológicos, mientras que no se observó efecto significativo en la curva de inactivación de pH-dependiente.

60 **[0059]** En consecuencia, la corriente de ventana no inactivante ASIC3 es notablemente mayor en presencia de ácido araquidónico (Fig. 4D, panel superior), lo que conduce a la activación del canal a valores de pH cercanos al pH fisiológico de reposo (es decir, pH 7,4) (Fig. 4D, panel inferior).

65 **[0060]** Estos resultados indican que el ácido araquidónico potencia preferentemente corrientes ASIC3 activadas por acidez moderada a través de un efecto de gran alcance en la corriente ventana no inactivante. De forma muy significativa, la figura 4E muestra que el efecto del ácido araquidónico se añade el efecto de la hipertonicidad en la

misma corriente ASIC3. Este resultado sugiere fuertemente que ASIC3 puede integrar distintas señales inflamatorias tales como la hipertonicidad, la acidificación moderada y ácido araquidónico.

Ejemplo 6: contribución de ASIC3 en dolor cutáneo inducido por la acidificación moderada

5 **[0061]** La alta expresión de ASIC3 en las neuronas cutáneas de ganglios raquídeos y la modulación a pH moderado por estímulos inflamatorios tales como la hiperosmolaridad y el ácido araquidónico ha conducido a buscar el papel de ASIC3 en dolor ácido cutáneo en condiciones normales e inflamatorias.

10 **[0062]** La Figura 5A muestra el comportamiento de las ratas al dolor después de la inyección por vía subcutánea soluciones moderadamente ácidas (pH 7,4, pH 7,2, pH 6,9 y pH 6,6) en una de las patas traseras. Un comportamiento significativo del dolor aparece a pH 6,9 (puntuación de estremecimiento aumenta de $2,11 \pm 0,67$ a pH 7,4 a $11,11 \pm 2,54$ a pH 6,9, $n = 14$ y 22 , respectivamente, $P < 0,05$, prueba de Kruskal-Wallis seguida por prueba post hoc por pares de Dunn). Este comportamiento del dolor se suprime en presencia de la toxina APETx2 resaltando así la implicación de ASIC3 en la detección de dolor ácido por vía subcutánea.

15 **[0063]** En la medida en que la hipertonicidad y el ácido araquidónico aparecen como fuertes activadores sinérgicos del canal ASIC3 a pH moderado tanto en las neuronas cutáneas de ganglios raquídeos y células F-11 que expresan canales recombinantes (cf. Figuras 2, 3 y 4), estas señales inflamatorias fueron co-inyectados (2% de NaCl, -600 mOsm.kg⁻¹ y AA 10 mM) junto con un pH moderado (Figura 5A). La combinación de estos tres elementos clave del cóctel inflamatorio aumenta la puntuación estremecimiento de las ratas en comparación al pH 6,9 solo ($11,1 \pm 2,54$, $n = 22$ a $20,42 \pm 2,53$, $n = 25$, $P < 0,05$, prueba de Kruskal-Wallis seguido por prueba post hoc de Dunn) (Figura 5 A).

20 **[0064]** Este comportamiento al dolor ácido disminuyó grandemente por la toxina péptidica APETx2, el inhibidor específico de ASIC3 ([ref. 38], supra), mientras que el inhibidor específico de la toxina PcTx1 ASIC1a no tiene efecto significativo (Figura 5A).

25 **[0065]** Estos resultados en conjunto sugieren fuertemente que el ASIC3 es el sensor principal del dolor cutáneo inducido por la acidificación moderada y que participa en el dolor inflamatorio en la rata.

30 **Ejemplo 7: contribución de ASIC3 al desarrollo de la hiperalgesia térmica inducida por la inflamación provocada por el adyuvante completo de Freund (CFA) en ratas**

35 **[0066]** Los efectos de las toxinas peptídicas APETx2 (inhibidor de canales que contienen la isoforma ASIC3) y PcTx1 (inhibidor de canales homómeros ASIC1A) se ensayaron en un modelo de dolor cutáneo (hiperalgesia térmica inducida por CFA) en ratas para confirmar el papel específico de ASIC3 en el dolor inflamatorio.

40 **[0067]** La Figura 5B muestra que cuatro horas después de la inducción de la inflamación por inyección de CFA en una pata trasera, apareció una hiperalgesia térmica significativa.

45 **[0068]** En contraste, la hiperalgesia térmica no se desarrolla cuando la toxina peptídica APETx2 se co-inyecta con CFA, mientras la toxina PcTx1 no tiene ningún efecto significativo.

50 **[0069]** Veinte horas después de la inyección de CFA, los animales tratados con la toxina de péptidos APETx2 no presentan un comportamiento diferente del de los animales de control inyectados con el vehículo en términos de hiperalgesia térmica (no se muestran datos), que ilustra la probable desaparición gradual del efecto de la toxina con el tiempo.

55 **[0070]** Estos resultados indican que ASIC3, pero no ASIC1a, juega un papel importante en la sensación de dolor inflamatorio a nivel periférico en ratas.

Ejemplo 8 Efecto inhibitorio específico de la toxina APETx2 *in vivo*

60 **[0071]** La demostración de la especificidad de la inhibición de los canales ASIC3 por la toxina APETx2 a nivel celular (en neuronas cultivadas y líneas celulares F-11transfectadas) a generado la búsqueda de evidencia de que los efectos analgésicos de APETx2 observados en ratas eran resultado exclusivamente de una inhibición de la actividad del canal de tipo ASIC3. Para hacer esto, se llevó a cabo un enfoque de inhibición genética de los canales ASIC3, consistente en observar el efecto de inyecciones intratecales de ARN de interferencia (ARNi) dirigidas específicamente contra los canales ASIC3 en ratas.

65 **[0072]** La Figura 6A muestra el efecto de inyecciones intratecales de ARNi específicas de los canales ASIC3 en los niveles de expresión de los canales de iones distintos, en las neuronas sensoriales de rata que inervan las patas traseras. Los resultados mostraron que los ARNi intratecales específicos de los canales ASIC3 permiten reducir en gran medida y sólo la expresión de los canales de ASIC3 en las neuronas sensoriales de rata (cf. la flecha negro).

5 **[0073]** La Figura 6B muestra que las ratas con inyecciones intratecales ARNi específicas de los canales ASIC3 durante 3 días antes de la inducción de la inflamación inducida por adyuvante completo de Freund (CFA) (cf. inserto) no desarrollan hiperalgia térmica inflamatoria (ARNi, columna negra) en comparación con las ratas de control tratadas con ARNi que interfieren con la composición idéntica pero de secuencia aleatoria (control, columna blanca). Este resultado es idéntico al obtenido con los animales tratados con toxina APETx2 (cf. ejemplo 7).

[0074] Estos resultados demuestran que los canales ASIC3 son mediadores del dolor inflamatorio, y los efectos analgésicos de la toxina APETx2 resultan exclusivamente de bloqueo de estos canales en el animal.

10 **Ejemplo 9: efecto inhibitor de la toxina APETx2 en el clon humano ASIC3**

15 **[0075]** El efecto inhibitor de la toxina peptídica APETx2 se probó en canales ASIC3 humanos. Para ello, la amplitud de las corrientes ASIC3 humano fue registrado por la técnica de patch-clamp descrita anteriormente, debido a la acidificación del medio extracelular (pH 8, pH 7 0, 0, cf. Flecha doble) en ausencia o presencia de la toxina APETx2 a 1 μ M, de la línea de neuronas sensoriales F-11 transfectadas con el clon humano ASIC3 como se describió anteriormente.

[0076] La Figura 7 muestra que la amplitud de las corrientes de canales ASIC3 humanas se redujo significativamente en presencia de la toxina APETx2 (picos 3° a 5° desde la izquierda).

20 **[0077]** Estos resultados indican claramente que la toxina APETx2 es capaz de inhibir la actividad de los canales ASIC3 humanos, y validar el uso potencial de la toxina APETx2 y sus derivados como nuevo compuesto analgésico en seres humanos .

LISTA DE REFERENCIAS

[0078]

- 5
- 10
- 15
- 20
- 25
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65
- [ref. 1] Wemmie et al., Trends Neurosci., 29 : 578-586, 2006
- [ref. 2] Lingueglia, J. Biol. Chem., 282 : 17325-17329, 2007
- [ref. 3] Jasti et al., Nature, 449 : 316-323, 2007
- [ref. 4] Lingueglia et al., J. Biol. Chem., 272 : 29778-29783, 1997
- [ref. 5] Benson et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 95 : 10240-10245, 2002
- [ref. 6] Hesselager et al., J. Biol. Chem., 279 : 11006-11015, 2004
- [ref. 7] Waldmann et al., J. Biol. Chem., 272 : 20975-20978, 1997a
- [ref. 8] Bassler et al., J. Biol. Chem., 276 : 33782-33787, 2001
- [ref. 9] Reeh & Steen, Prog. Brain Res., 113 : 143-151, 1996
- [ref. 10] Woo et al., Anesthesiology, 101 : 468-475, 2004
- [ref. 11] Steen et al., Neurosci. Lett., 199 : 29-32, 1995a
- [ref. 12] Issberner et al., Neurosci. Lett., 208 : 191-194, 1996
- [ref. 13] Ugawa et al., J. Clin. Invest., 110 : 1185-1190, 2002
- [ref. 14] Jones et al., J. Neurosci., 24 : 10974-10979, 2004
- [ref. 15] Waldmann et al., Nature, 386 : 173-177, 1997b
- [ref. 16] Dube et al., Pain, 117 : 88-96, 2005
- [ref. 17] Voilley et al., J. Neurosci., 21 : 8026-8033, 2001
- [ref. 18] Molliver et al., Mol. Pain, 1 : 35, 2005
- [ref. 19] Yagi et al., Circ. Res., 99 : 501-509, 2006
- [ref. 20] Sutherland et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 98 : 711-716, 2001
- [ref. 21] Price et al., Neuron, 32 : 1071-1083, 2001
- [ref. 22] Sluka et al., Pain, 106 : 229-239, 2003
- [ref. 23] Sluka et al., Pain, 129 : 102-112, 2007
- [ref. 24] Xie et al., J. Neurophysiol., 87 : 2835-2843, 2002
- [ref. 25] Chen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 99 : 8992-8997, 2002
- [ref. 26] Babinski et al., J. Biol. Chem., 275 : 28519-28525, 2000
- [ref. 27] Askwith et al., Neuron, 26 : 133-141, 2000
- [ref. 28] Moczydlowski et al., J. Membr. Biol., 105 : 95-111, 1988
- [ref. 29] Norton, Toxicol., 29 : 1051-1084, 1991
- [ref. 30] Harvey et al., Ann. NY Acad. Sci., 710 : 1-10, 1994
- [ref. 31] Uchitel, Toxicol., 35 : 1161-1191, 1997
- [ref. 32] Tytgat et al., Trends Pharmacol. Sci., 20 : 444-447, 1999
- [ref. 33] Escoubas et al., Biochimie, 82 : 893-907, 2000b
- [ref. 34] Hugues et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 79 : 1308-1312, 1982
- [ref. 35] Shakkottai et al., J. Biol. Chem., 276 : 43145-43151, 2001
- [ref. 36] Escoubas et al., J. Biol. Chem., 275(33) : 25116-25121, 2000
- [ref. 37] Mazzuca et al., Nature Neurosci., 10(8) : 943-945, 2007
- [ref. 38] Diochot et al., Embo J., 23 : 1516-1525, 2004
- [ref. 39] Bruhn et al., Toxicol., 39 : 693-702, 2001
- [ref. 40] Diochot et al., Mol. Pharmacol., 64 : 59-69, 2003
- [ref. 41] Diochot et al., J. Biol. Chem., 273 : 6744-6749, 1998
- [ref. 42] Wu et al., Anal. Biochem., 235 : 161-174, 1996
- [ref. 43] Chagot et al., Protein Sci., 14 : 2003-2010, 2005
- [ref. 44] Platika et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 82 : 3499-3503, 1985
- [ref. 45] Francel et al., J. Neurochem., 48 : 1624-1631, 1987
- [ref. 46] Deval et al., J. Biol. Chem., 281 : 1796-1807, 2006
- [ref. 47] Ettaiche et al., J. Neurosci., 26 : 5800-5809, 2006
- [ref. 48] Hamill et al., Pflugers Arch., 391 : 85-100, 1981
- [ref. 49] Tominaga et al., Neuron, 21 : 531-543, 1998
- [ref. 50] Steen et al., J. Neurosci., 15 : 3982-3989, 1995b
- [ref. 51] Vakili et al., Surg. Forum, 21 : 227-228, 1970
- [ref. 52] Allen & Attwell, J. Physiol., 543 : 521-529, 2002
- [ref. 53] Smith et al., Neuroscience, 145 : 686-698, 2007
- [ref. 54] Mamet et al., J. Neurosci., 22 : 10662-10670, 2002
- [ref. 55] Deval et al., Neuropharmacology, 44 : 662-671, 2003
- [ref. 56] Qi et al., Biochemistry, 40 : 4531-4538, 2001
- [ref. 57] Chen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 95 : 10240-10245, 1998
- [ref. 58] Bode et al., Nature, 409 : 35-36, 2001
- [ref. 59] Alessandri-Haber et al., Pain, 118 : 70-79, 2005
- [ref. 60] Ikauchi et al., J. Pain, 10:336-342, 2009
- [ref. 61] Ständer et Schmeiz, Eur. J. Pain, 10 : 473-478

LISTA DE SECUENCIAS

5

[0079]

<110> CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE - CNRS

10

DEVAL, Emmanuel
DIOCHOT, Sylvie
LAZDUNSKI, Michel
LINGUEGLIA, Eric
NOEL, Jacques

15

<120> EFECTOS ANALGÉSICOS DE LA TOXINA PEPTÍDICA APETX2

<130> 104025/PCT
<150> FR 08/03158
<151> 06-06-2008

20

<160> 2

<170> Patentin versión 3.5

25

<210> 1
<211> 19
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

30

<220>
<223> Control de ARNi

35

<400> 2
gctcacacta cgagagat

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5
1. La toxina peptídica APETx2 de la anémona de mar *Anthopleura elegantissima*, péptidos aislados de otros venenos de la anémona de mar y otras especies marinas de la misma familia con 60 a 99% de identidad de secuencia con la secuencia de 42 aminoácidos de la toxina peptídica APETx2, y péptidos aislados del veneno de la
- 10 anémona de mar *Anthopleura elegantissima* que tiene (i) al menos una sustitución en las posiciones 3, 5, 8, 9, 10, 15-17, 23, 31-33, 36, 39 y 41 o (ii) una extensión de al menos un aminoácido en los extremo N-y/o C terminales de la secuencia de 42 aminoácidos de la toxina peptídica APETx2, para uso como medicamento analgésico, dichos péptidos conservando la propiedad de la toxina peptídica para inhibir los canales de tipo APETx2 ASIC3.
- 15 2. La toxina peptídica APETx2 y péptidos para uso de acuerdo con la reivindicación 1 en la prevención o el tratamiento del dolor inducido por activación de los canales de tipo ASIC3de.
3. La toxina peptídica APETx2 y péptidos para uso de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el dolor resulta de la inflamación.
- 20 4. La toxina peptídica APETx2 y péptidos para uso de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el dolor se produce por acidosis tisular.
- 25 5. La toxina peptídica APETx2 y péptidos para su uso según la reivindicación 4, en el que las condiciones dolorosas se seleccionan del grupo que consistente en isquemias, fracturas, hematomas, edema, formación de ampollas, infecciones locales, incluyendo lesiones tisulares, incisiones relacionadas con un procedimiento quirúrgico, lesiones oculares y tumores incluyendo tumores y metástasis óseas.
- 30 6. La toxina peptídica APETx2 y péptidos para uso de acuerdo con la reivindicación 1 en la prevención o tratamiento del prurito.
7. La toxina peptídica APETx2 y péptidos para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicho medicamento se administra de manera periférica.
- 35 8. La toxina peptídica APETx2 y péptidos para su uso según en la reivindicación 7, en el que dicho medicamento es para ser administrado por vía subcutánea.
9. La toxina peptídica APETx2 y péptidos para su uso según la reivindicación 7, en el que dicho medicamento es para ser administrado por vía intramuscular.
- 40 10. La toxina peptídica APETx2 y péptidos para su uso según la reivindicación 7, en el que dicho medicamento es para ser administrado por vía transcutánea.
11. La toxina peptídica APETx2 y péptidos para su uso según la reivindicación 7, en el que dicho medicamento es para ser administrado por vía cutánea.

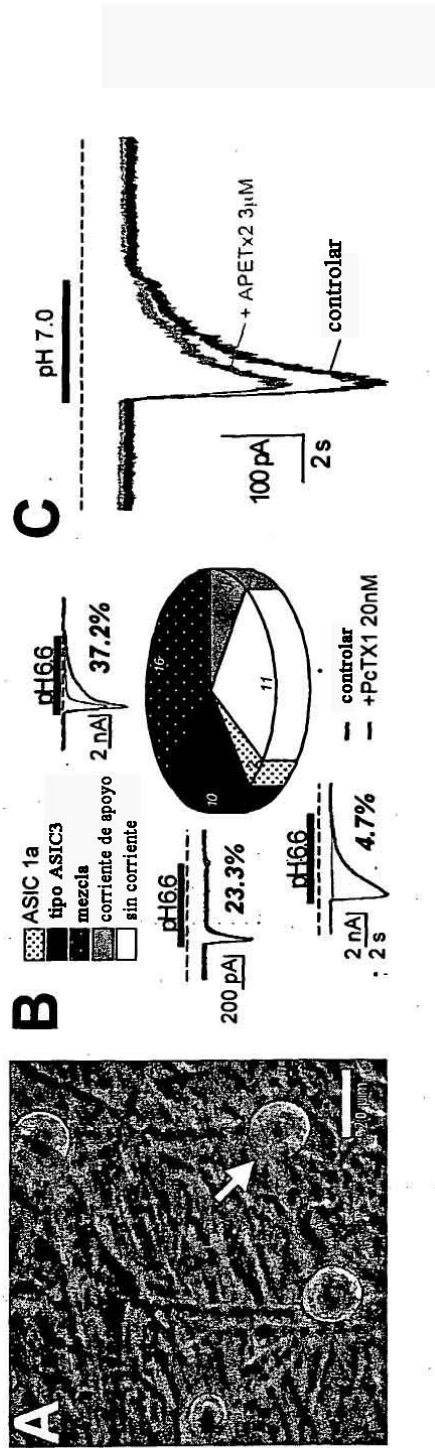


FIGURA 1

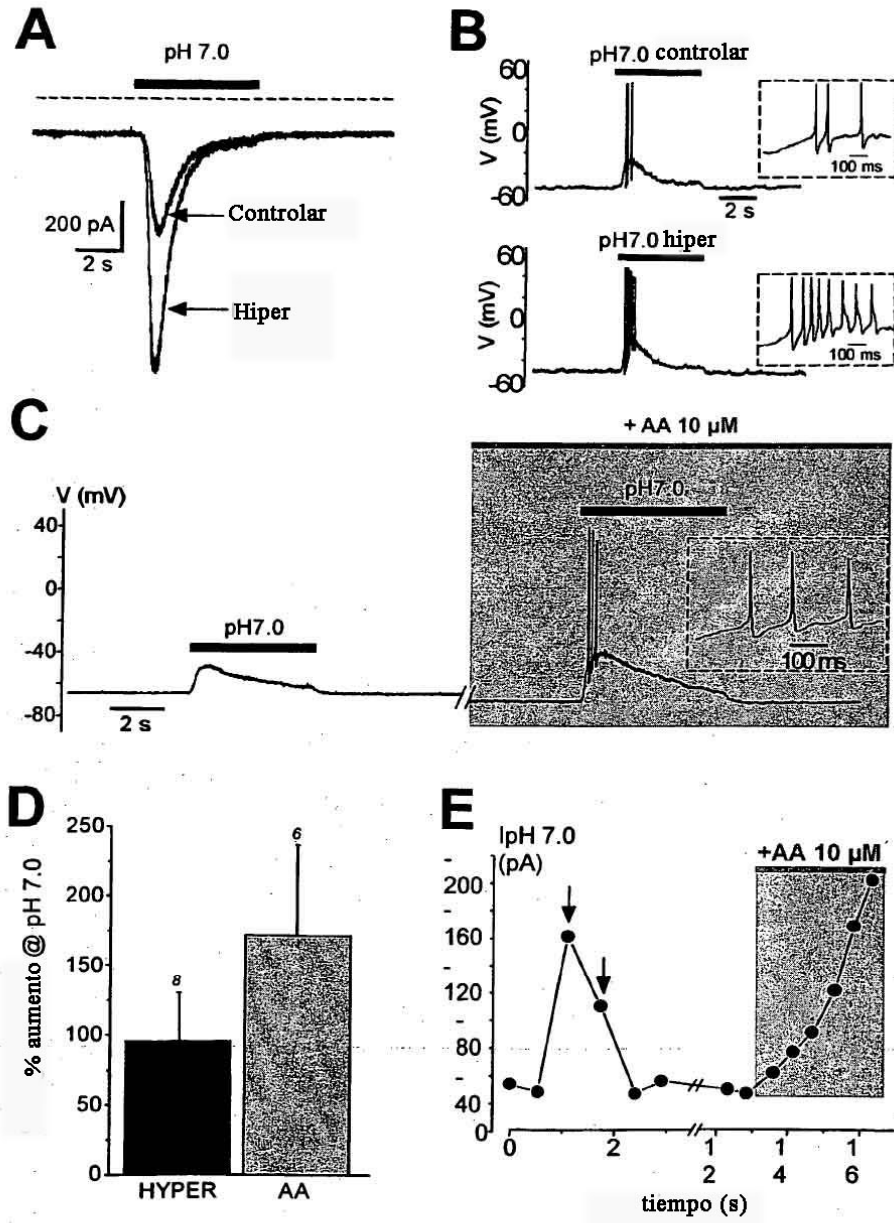


FIGURA 2

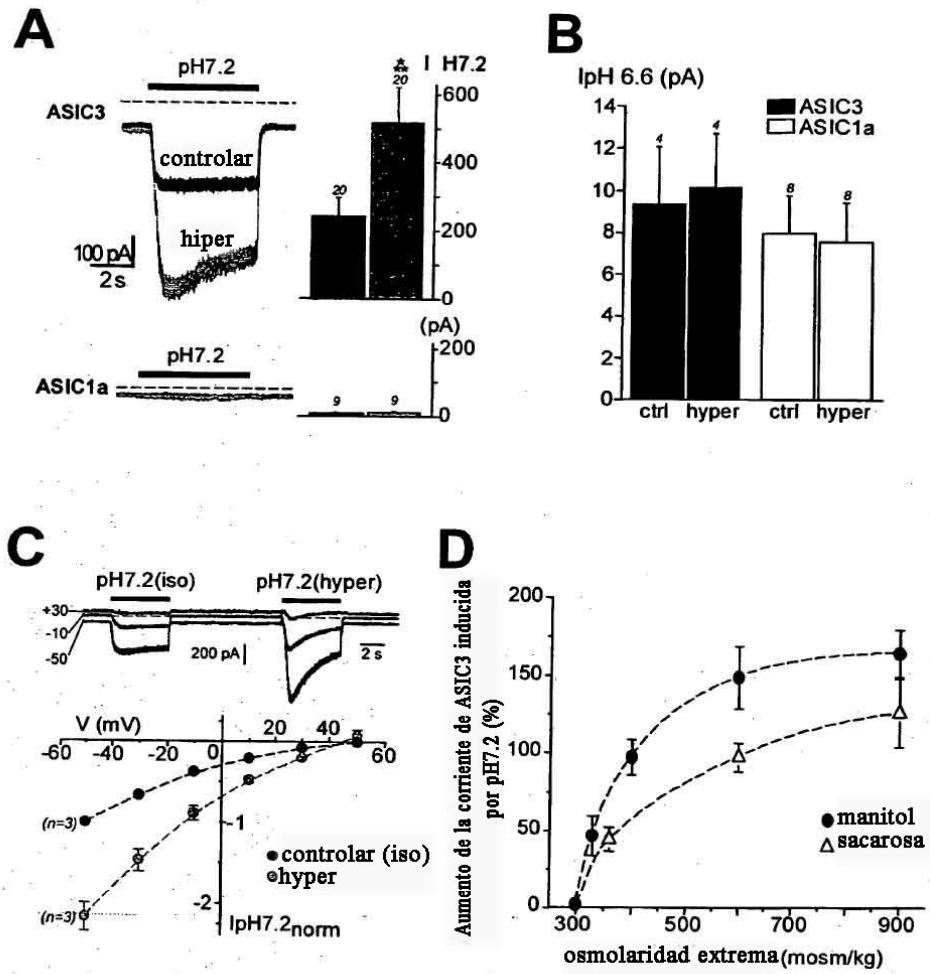


FIGURA 3

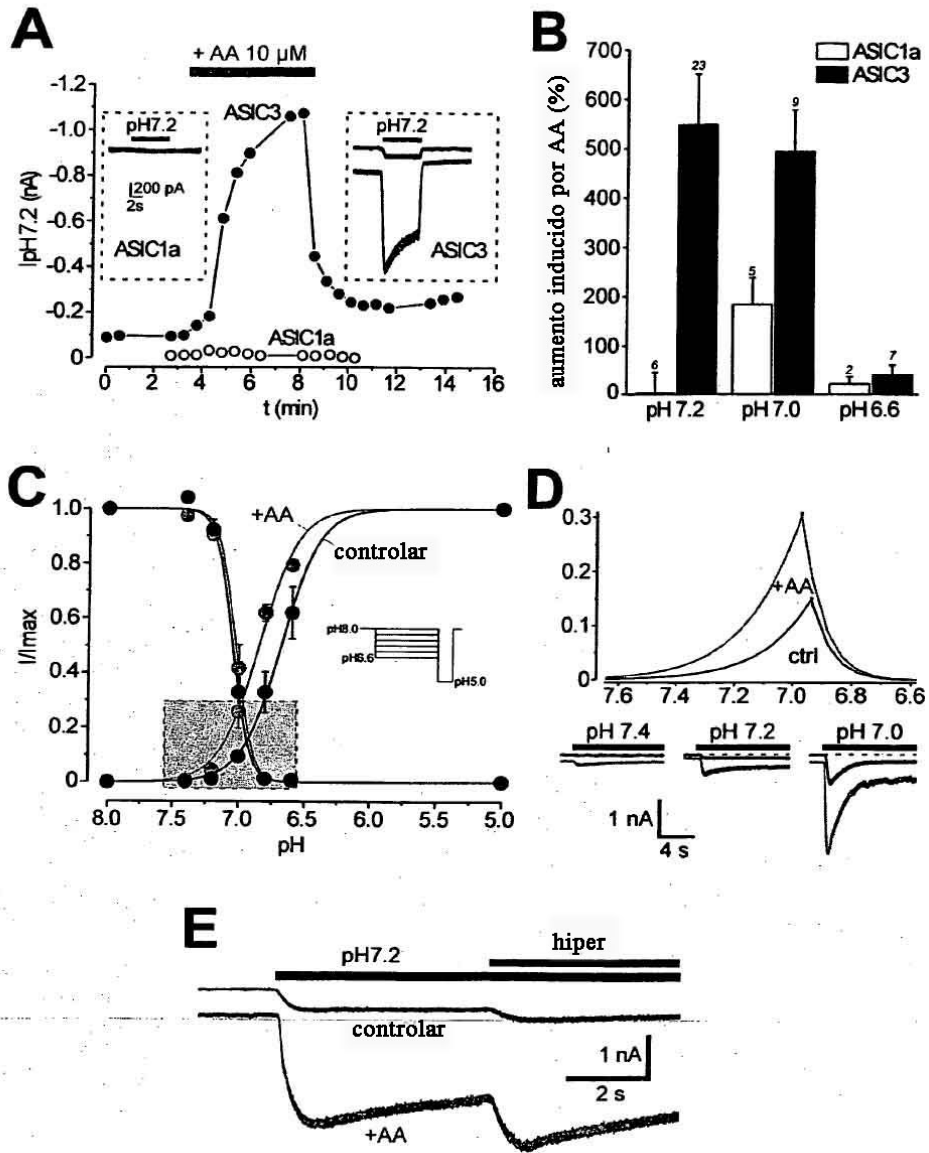


FIGURA 4

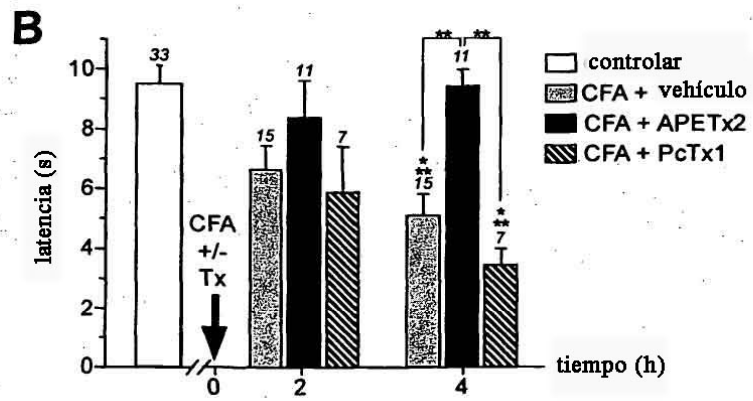
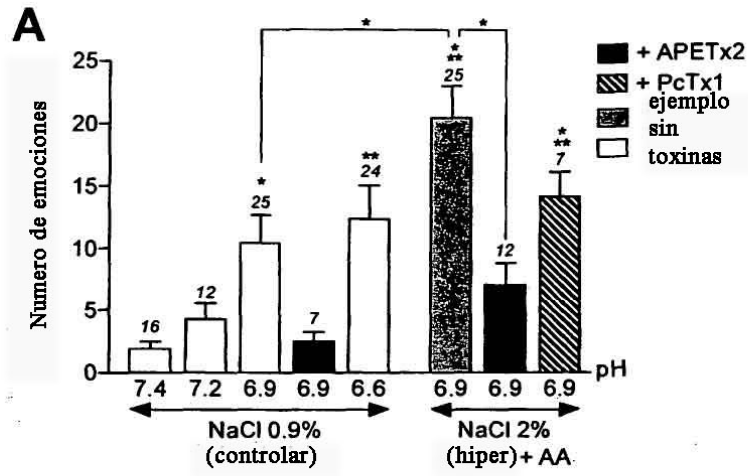


FIGURA 5

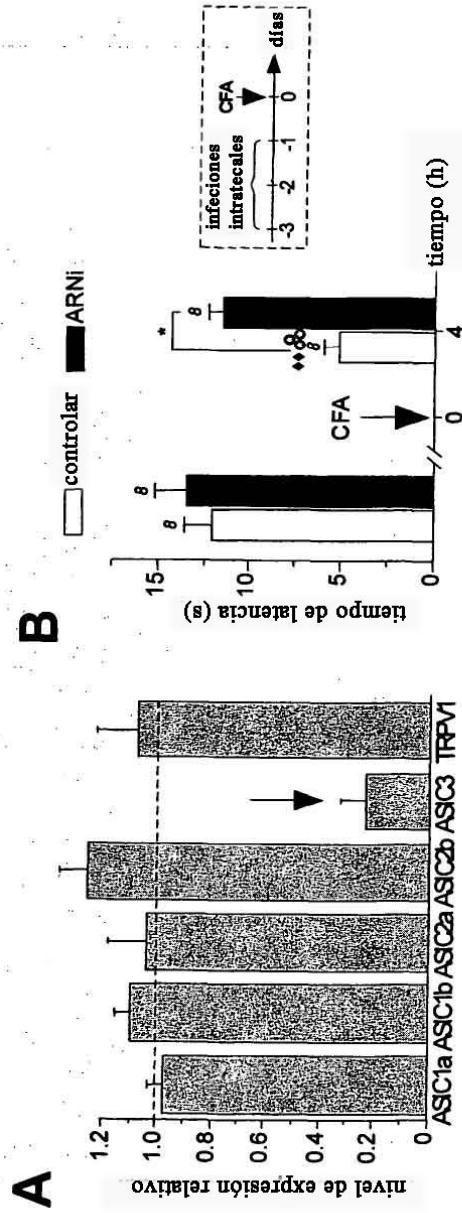


FIGURA 6

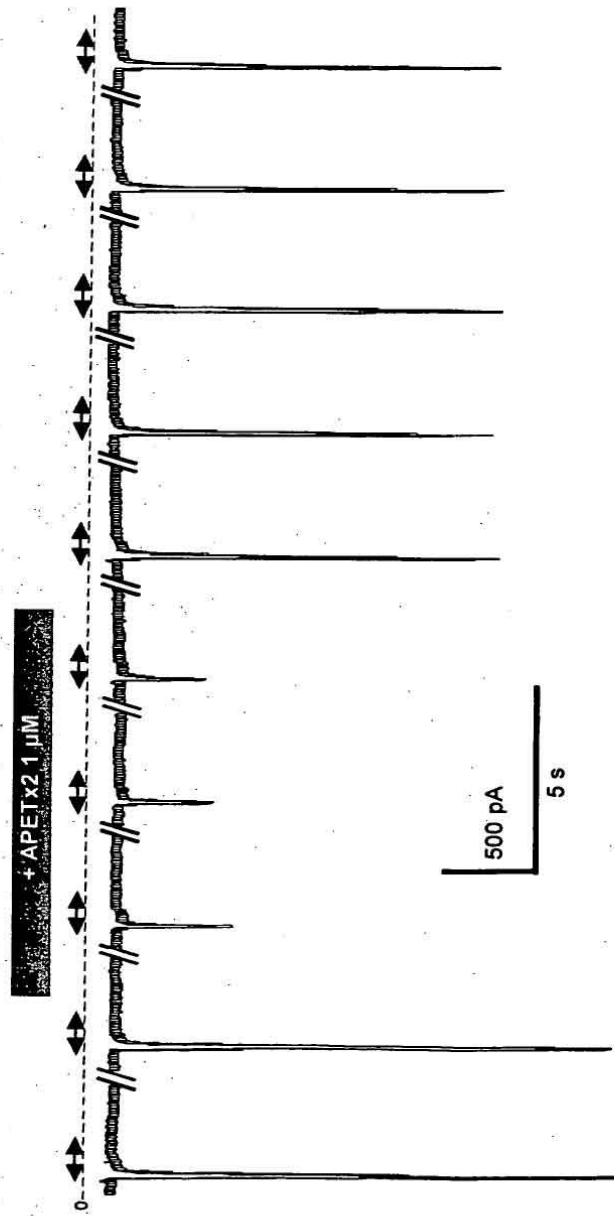


FIGURA 7