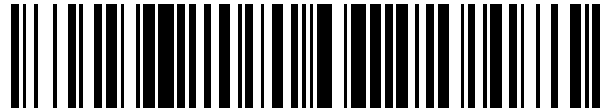


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 517 925**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.09.2010 E 10771161 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.08.2014 EP 2480893**

54 Título: **Utilización de activadores de canales potásicos K2P como analgésicos**

30 Prioridad:

**21.09.2009 FR 0956477**

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

**04.11.2014**

73 Titular/es:

**UNIVERSITE D'AUVERGNE CLERMONT I  
(100.0%)  
49 Bd François Mitterrand  
63000 Clermont Ferrand, FR**

72 Inventor/es:

**ESCHALIER, ALAIN;  
BUSSEROLLES, JÉRÔME;  
ALLOUI, ABDELKRIM y  
LAZDUNSKI, MICHEL**

74 Agente/Representante:

**CURELL AGUILÁ, Mireia**

**ES 2 517 925 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

Utilización de activadores de canales potásicos K2P como analgésicos.

5 La presente invención se refiere al tratamiento y a la prevención del dolor. Más particularmente, la presente invención demuestra la implicación de los canales potásicos K2P en el efecto analgésico de la morfina. La presente invención proporciona por lo tanto un método de cribado para la identificación de analgésicos.

10 El dolor se puede definir como una experiencia sensorial y emocional desagradable relacionada con una lesión tisular existente o potencial, o describir en términos de dicha lesión. En la práctica, el tratamiento del dolor percibido por el paciente es el resultado de la interacción entre el fenómeno que genera el dolor, las capacidades del individuo para integrarlo, y la respuesta de los profesionales en la situación de reconocerlo y tratarlo.

15 Por lo menos el 50% de los pacientes adultos hospitalizados sufren del dolor (Durieux *et al.*, 2001 Presse Med. 30:572-6). La intensidad del dolor post-operatorio puede ser un factor de riesgo de la persistencia de un dolor más allá de este periodo (Basbaum *et al.*, 1999 Curr Biol. 9:R429-31) y su control eficaz está asociado a una reducción de las complicaciones post-operatorias. Los dolores crónicos persistentes son fuentes de las principales alteraciones de la calidad de vida, de incapacidad y de minusvalías. Inducen un consumo importante de cuidados, así como numerosas bajas laborales. En una gran encuesta europea, una quinta parte de los sujetos interrogados por teléfono ha declarado sufrir dolores crónicos, para los cuales el 85% de ellos precisan haber consultado durante los últimos 6 meses, por lo menos una vez a un médico. Así, en su práctica cotidiana, cualquier médico se enfrenta a este tipo de pacientes y este número aumentará a la vista del envejecimiento de la población. El dolor es también el síntoma más frecuente relacionado con el cáncer. Afecta del 30 al 50% de los pacientes con cáncer, en todas las fases, y del 65 al 90% de los pacientes en una fase avanzada. La gran mayoría de los pacientes entrevistados que sufren de dolores crónicos indican recibir un tratamiento analgésico medicamentoso. Los medicamentos por prescripción citados más frecuentemente son los anti-inflamatorios y los opioides débiles, mientras que los opioides fuertes lo son con una frecuencia del orden del 5%. En lo que se refiere a los medicamentos de venta libre, los medicamentos mencionados son los anti-inflamatorios y el paracetamol, y en una menor medida los opioides débiles en los países en los que pueden ser obtenidos sin prescripción médica (Breivik *et al.*, 2006 Eur J Pain. 10:287-333).

20 El tratamiento medicamentoso de los dolores sigue siendo problemático con medicamentos cuyas relaciones beneficio/riesgo, en función de los pacientes (susceptibilidad individual a los tratamientos, sujetos de edad avanzada, niños, etc.) no siempre están a favor de los efectos beneficiosos. Las innovaciones terapéuticas no son frecuentes y los productos antiguos se utilizan todavía en primera instancia en numerosas indicaciones.

25 Los analgésicos opioides agrupan la morfina y el conjunto de los derivados semi-sintéticos o sintéticos de este alcaloide. La morfina sigue siendo el producto de referencia en el tratamiento de los dolores intensos por exceso de nocicepción, en particular los dolores post-operatorios y los dolores cancerosos. Los opioides presentan unos efectos analgésicos pero también psicodislépticos, depresivos respiratorios, eméticos, cardiovasculares, sobre la musculatura lisa y sobre el sistema inmunitario. Los efectos indeseables relacionados con el uso de los opioides se caracterizan por el estreñimiento casi sistemático, náuseas y vómitos en más de la mitad de los pacientes, una sedación frecuente, el riesgo de depresión respiratoria que necesita una supervisión, y alucinaciones o confusión en el sujeto de edad avanzada que, a pesar de ser raras, necesitan una reducción de las dosis. Además, los efectos de estreñimiento constituyen un obstáculo importante en particular en la persona de edad avanzada y en cancerología.

30 La morfina produce sus efectos a través de la activación de receptores opioides, de los cuales se conocen tres subtipos ( $\mu$ ,  $\delta$  y  $\kappa$ ). Los efectos terapéuticos (analgésico) e indeseables (por ejemplo el estreñimiento y la depresión respiratoria) implican preferentemente la activación del receptor  $\mu$  (Roy *et al.*, 1998 Brain Res Mol Brain Res. 56:281-3). La voluntad de disociar estos efectos impone por lo tanto trabajar aguas abajo de este receptor. Aunque no se conoce el mecanismo exacto de acción, la relación de la morfina con el receptor  $\mu$  provoca la activación de proteínas  $G_{i/o}$ , la inhibición de la adenilato ciclasa, la activación de la fosfolipasa C y, consecuentemente, la inhibición de canales de calcio dependientes de voltaje, así como la activación de canales de potasio (Zuo, 2005 Anesth. Analg. 101:728-34). Entre los canales de potasio, dos canales de rectificación entrante, los canales GIRK y los canales dependientes de ATP ( $K_{ATP}$ ), se han descrito como implicados, en parte, en el efecto analgésico de la morfina (Ocaña *et al.*, 2004 Eur J Pharmacol. 500:203-19).

35 El estado de la técnica y en particular el documento US nº 7.112.403 describe un método de identificación de sustancias que tienen propiedades anestésicas con el fin de producir en un mamífero un estado de inconsciencia reversible con una amnesia simultánea y un efecto analgésico cuando se inhala, mediante la utilización de las proteínas de transporte de potasio en la que una activación del transporte del potasio es indicativa de que la sustancia a identificar tiene propiedades anestésicas.

40 El estado de la técnica Alloui *et al.*, 2008 Doull. et Analg. 21:215-220 identifica los canales potásicos TREK-1 como diana para el descubrimiento de nuevos compuestos analgésicos.

45 Sin embargo, hasta la actualidad no se ha descrito la implicación potencial de otros canales de potasio, tales como

los canales potásicos K2P, en el efecto analgésico de la morfina.

Con el fin de evitar los efectos indeseables de la morfina, la industria farmacéutica desarrolla actualmente o bien unos analgésicos opioides sin acción sobre los receptores  $\mu$ , o bien unos antagonistas periféricos de los receptores  $\mu$  que se oponen no obstante solamente a los efectos de estreñimiento, y no a los efectos depresores respiratorios. Sin embargo, los primeros corren el riesgo de tener una eficacia analgésica menor que la de los agonistas de los receptores  $\mu$ , y los segundos deben ser co-prescritos con los opioides.

Por lo tanto, sería deseable obtener un analgésico tan eficaz como la morfina, pero sin los efectos de estreñimiento y depresor respiratorio, dos efectos indeseables importantes en términos respectivamente de frecuencia y de gravedad.

### Descripción de la invención

Los inventores demuestran por primera vez la implicación de los canales potásicos K2P, y más particularmente de TREK-1 y de TRAAK, en el efecto analgésico de la morfina. Así, la delección del gen que codifica TREK-1 o TRAAK conduce a la supresión del efecto analgésico del opiáceo. Por otra parte, la depleción del gen que codifica TREK-1 o TRAAK no reduce el efecto de estreñimiento y/o de depresor respiratorio de la morfina. Los canales TREK-1 y TRAAK son por lo tanto necesarios para la acción analgésica, pero no participan en estos efectos indeseables. Los canales potásicos K2P de la familia TREK/TRAAK se pueden utilizar por lo tanto como dianas para cribar nuevos analgésicos tan eficaces como la morfina con una mejor relación beneficio/riesgo.

La presente invención proporciona por lo tanto un método de cribado para aislar nuevos analgésicos eficaces y bien tolerados, y permite por lo tanto la síntesis, la validación, el desarrollo y la formulación de los analgésicos así seleccionados.

### Utilización de los canales potásicos K2P como dianas

Los canales potásicos TREK-1 y TRAAK están implicados en el efecto analgésico de la morfina, pero no en sus efectos indeseables, por lo tanto los canales potásicos K2P de la familia TREK/TRAAK son útiles como dianas durante cribados para identificar unos compuestos analgésicos. Los compuestos analgésicos así identificados se caracterizan por que no presentan los efectos de estreñimiento y/o de depresor respiratorio.

Se describe por lo tanto un método de cribado para la identificación de un compuesto analgésico que comprende las etapas siguientes:

- a) identificar un activador de un canal potásico K2P por cribado de compuestos candidatos;
- b) medir el efecto analgésico de dicho activador; y
- c) medir el efecto de estreñimiento y/o de depresor respiratorio de dicho activador.

El método según la invención puede comprender la etapa suplementaria de selección de un compuesto analgésico sin efecto de estreñimiento y/o de depresor respiratorio.

Por "compuesto analgésico" se entiende en la presente memoria un compuesto capaz de atenuar o quitar el dolor.

Por "canal potásico K2P" se entiende en la presente memoria la familia UniProt nº TC 1.A.1.8 (también denominada "two pore domain potassium channel family") El canal potásico K2P según la invención se selecciona de entre los miembros de la familia TREK/TRAAK, más particularmente de entre TREK-1, TREK-2 y TRAAK.

Por "canal TREK-1" se entiende en la presente memoria un canal potásico K2P que comprende por lo menos una sub-unidad cuya secuencia se muestra en la entrada Swiss-Prot nº O95069 (SEC ID nº 1) o cuya secuencia es derivada de esta secuencia. Preferentemente, el canal TREK-1 es un canal constituido por dos sub-unidades de secuencias seleccionadas de entre la secuencia SEC ID nº 1 y sus secuencias derivadas. El canal TREK-1 puede, por ejemplo, ser un canal homodimérico constituido por dos sub-unidades de secuencia SEC ID nº 1.

Por "canal TREK-2" se entiende en la presente memoria un canal potásico K2P que comprende por lo menos una sub-unidad cuya secuencia se muestra en la entrada Swiss-Prot nº P57789 (SEC ID nº 2) o cuya secuencia se deriva de esta secuencia. Preferentemente, el canal TREK-2 es un canal constituido por dos sub-unidades de secuencias seleccionadas de entre la secuencia SEC ID nº 2 y sus secuencias derivadas. El canal TREK-2 puede, por ejemplo, ser un canal homodimérico constituido por dos sub-unidades de secuencia SEC ID nº 2.

Por "canal TRAAK" se entiende en la presente memoria un canal potásico K2P que comprende por lo menos una sub-unidad cuya secuencia se muestra en la entrada Swiss-Prot nº Q9NYG8 (SEC ID nº 3) o cuya secuencia se deriva de esta secuencia. Preferentemente, el canal TRAAK es un canal constituido por dos sub-unidades de secuencias seleccionadas de entre la secuencia SEC ID nº 3 y sus secuencias derivadas. El canal TRAAK puede, por ejemplo, ser un canal homodimérico constituido por dos sub-unidades de secuencia SEC ID nº 3.

Las "secuencias derivadas" incluyen en particular las variantes de corte y empalme, las variantes alélicas, y las secuencias homólogas en especies mamíferas no humanas. Las secuencias derivadas incluyen en particular secuencias por lo menos el 50, 60, 70, 80, 85, 90, 95 o 99% idénticas a una de las secuencias SEC ID nº 1, SEC ID nº 2 o SEC ID nº 3.

Por "secuencia de aminoácidos por lo menos el 95% (por ejemplo) idéntica a una secuencia de referencia" se entiende una secuencia idéntica a la secuencia de referencia, salvo que esta secuencia puede comprender hasta cinco mutaciones (sustituciones, deleciones y/o inserciones) para cada parte de cien aminoácidos de la secuencia de referencia. Así, para una secuencia de referencia de 100 aminoácidos, un fragmento de 95 aminoácidos y una secuencia de 100 aminoácidos que comprenden 5 sustituciones con respecto a la secuencia de referencia son dos ejemplos de secuencias al 95% idénticas a la secuencia de referencia. El porcentaje de identidad se determina generalmente utilizando un programa de análisis de secuencias. Las secuencias de aminoácidos a comparar son alineadas para obtener el mayor grado de identidad. Para ello, puede ser necesario introducir de manera artificial unos espacios ("gaps") en la secuencia. Una vez realizada la alineación óptima, el grado de identidad se establece por registro de todas las posiciones para las cuales los aminoácidos de las dos secuencias comparadas son idénticos, con respecto al número total de posiciones. Por ejemplo, se puede utilizar el programa "needle", que se refiere al algoritmo de alineación global "Needleman-Wunsch" para encontrar la alineación óptima (con "gaps") de dos secuencias sobre la totalidad de su longitud. Este programa está disponible en particular en el sitio ebi.ac.uk.

Las secuencias derivadas pueden diferir de la secuencia de referencia por sustitución, delección y/o inserción de uno o varios aminoácidos, y esto en unas posiciones tales que estas modificaciones no afecten significativamente a la actividad biológica de los péptidos. Las sustituciones pueden corresponder en particular a sustituciones conservadoras.

En un modo de realización particular, la secuencia de los derivados difiere de la secuencia SEC ID nº 1, 2 o 3, únicamente por la presencia de sustituciones conservadoras. Las sustituciones conservadoras son unas sustituciones de aminoácidos de misma clase, tales como sustituciones de aminoácido con cadenas laterales no cargadas (tales como la asparagina, la glutamina, la serina, la cisteína y la tirosina), de aminoácidos con cadenas laterales básicas (tales como la lisina, la arginina y la histidina), de aminoácidos con cadenas laterales ácidas (tales como el ácido aspártico y el ácido glutámico), de aminoácidos con cadenas laterales apolares (tales como la alanina, la valina, la leucina, la isoleucina, la prolina, la fenilalanina, la metionina y el triptófano).

Por "activador de un canal potásico K2P" se entiende en la presente memoria un compuesto capaz de aumentar la actividad biológica de un canal potásico K2P. Contrariamente a la morfina, los activadores descritos no tienen como efecto activar los receptores opioides. Así, están desprovistos de efecto de estreñimiento y/o de depresor respiratorio. Preferentemente, los activadores actúan directamente sobre el canal potásico K2P, es decir que interactúan directamente con dicho canal. Los activadores pueden también activar el canal potásico K2P a través de una cascada de señalización. En este segundo caso, los activadores actúan necesariamente más abajo de los receptores opioides, es decir que modulan la actividad de un componente de la cascada situado más arriba del canal potásico K2P, pero más abajo de los receptores opioides. El hecho de que un activador del canal potásico K2P actúe más abajo de los receptores opioides puede fácilmente ser ensayado comparando la actividad del canal potásico K2P en presencia y en ausencia de un inhibidor de los receptores opioides, tal como por ejemplo la naloxona. El hecho de que la actividad del canal potásico K2P es la misma en presencia y en ausencia del inhibidor de los receptores opioides indica que el activador actúa más abajo de los receptores opioides.

Son bien conocidos por experto en la materia unos métodos para determinar si un compuesto es capaz de aumentar la actividad biológica de un canal potásico K2P.

Es por ejemplo posible identificar un activador de un canal TREK-1 utilizando el método descrito por Alloui *et al.* (EMBO J. 2006 25:2368-76). Un método de este tipo puede, por ejemplo, comprender las etapas siguientes:

- proporcionar una célula que expresa un canal TREK-1 (por ejemplo una neurona DRG);
- medir la corriente en ausencia del compuesto candidato; y
- medir la corriente en presencia del compuesto candidato;

en el que un aumento de la corriente en presencia del compuesto candidato indica que el compuesto candidato es un activador del canal TREK-1. Dicha corriente puede, por ejemplo, ser inducida por un compuesto tal como el ácido araquidónico o por una acidificación intracelular. Más particularmente, los activadores del canal TREK-1 son capaces de producir un aumento de la intensidad de corriente de neuronas de ganglios raquídeos dorsales que provienen de ratones salvajes cuando la intensidad de la corriente se evalúa mediante la técnica denominada de "patch-clamp en condición de células enteras" en las condiciones descritas en Alloui *et al.* (EMBO J. 2006 25:2368-76).

Es asimismo posible identificar un activador de un canal TREK-1 utilizando el método descrito por Duprat *et al.* (Mol. Pharmacol. 2000, 57:906-912). En este método, unos sistemas de expresión heterólogos (por ejemplo unas células

COS) son transfectados con el gen que codifica TREK-1, después se miden las corrientes mediante la técnica denominada de "patch-clamp en condición de células enteras".

Los métodos descritos en Alloui *et al.* (EMBO J. 2006 25:2368-76) y en Duprat *et al.* (Mol. Pharmacol. 2000, 57:906-912) son también aplicables para el estudio de otros canales potásicos K2P distintos de TREK-1, sustituyendo los animales invalidados para TREK-1 por animales invalidados para el canal que se desea estudiar (por ejemplo TREK-2 o TRAAK).

Alternativamente, el método de cribado puede ser aplicado utilizando una plataforma de cribado de alto caudal adaptada al cribado de moduladores de canales potásicos (Falconer *et al.*, 2002 J Biomol Screen. 7:460-5; Ford *et al.*, 2002 Prog Drug Res. 58:133-68).

Los compuestos analgésicos así identificados se caracterizan por que no presentan un efecto de estreñimiento y/o de depresor respiratorio. Por otra parte, pueden también estar desprovistos de otros efectos indeseables.

Por compuesto que presenta un "efecto analgésico" se entiende en la presente memoria un compuesto capaz de atenuar o quitar el dolor. El efecto analgésico de un compuesto se puede medir mediante cualquier método bien conocido por el experto en la materia, por ejemplo mediante el ensayo de sensibilidad mecánica de von Frey o mediante el ensayo térmico de inmersión de la cola en agua caliente (véanse los ejemplos 1 y 2).

Por compuesto que presenta un "efecto de estreñimiento" se entiende en la presente memoria un compuesto capaz de disminuir la defecación. El efecto de estreñimiento de un compuesto se puede medir mediante cualquier método bien conocido por el experto en la materia, por ejemplo utilizando un método global de recogida de las heces (véanse los ejemplos 1 y 4).

Por compuesto que presenta un "efecto depresor respiratorio" se entiende en la presente memoria un compuesto capaz de disminuir la frecuencia respiratoria. El efecto depresor respiratorio de un compuesto se puede medir mediante cualquier método bien conocido por el experto en la materia, por ejemplo midiendo la frecuencia respiratoria gracias a un pletismógrafo barométrico (véanse los ejemplos 1 y 5).

Por compuesto "desprovisto de efecto de estreñimiento y/o de depresor respiratorio" se entiende un compuesto en presencia del cual la defecación y/o la frecuencia respiratoria es superior o igual al 70%, 80%, 90% o 95% del valor observado en ausencia de dicho compuesto. Preferentemente, la defecación y/o la frecuencia respiratoria no es disminuida de manera estadísticamente significativa en presencia de dicho compuesto. Siendo los efectos de estreñimiento y/o de depresor respiratorio dosis-dependientes, la ausencia de efecto de estreñimiento y/o de depresor respiratorio de un compuesto analgésico se evalúa preferentemente a una dosis equianalgésica a la cual la morfina produce un efecto analgésico.

En el ámbito de estos métodos de cribado, los compuestos candidatos pueden, por ejemplo, corresponder a ligandos naturales de un canal potásico K2P, de moléculas químicas, aptámeros, de péptidos y de anticuerpos. En un modo de realización preferido, los compuestos candidatos son pequeñas moléculas químicas ("small molecules").

En un modo de realización particular, se describe un método de cribado para la identificación de un compuesto analgésico que comprende las etapas siguientes:

- a) proporcionar un compuesto candidato;
- b) determinar si dicho compuesto candidato activa un canal potásico K2P;

en el que la determinación de que dicho compuesto candidato active dicho canal potásico K2P indica que dicho compuesto candidato es un compuesto analgésico.

Este método comprende además la etapa de medir el efecto analgésico de dicho compuesto candidato que activa dicho canal potásico K2P, y/o la etapa de medir el efecto de estreñimiento y/o de depresión respiratoria de dicho compuesto que activa dicho canal potásico K2P.

El método según la invención puede comprender la etapa suplementaria de selección de un compuesto analgésico sin efecto de estreñimiento y/o de depresor respiratorio.

Se describe también la utilización de un canal potásico K2P como diana para identificar un compuesto analgésico durante un cribado de compuestos candidatos. Más precisamente, una utilización de este tipo tiene como objetivo la identificación de activadores de canales potásicos K2P, que poseen un efecto analgésico.

Los métodos de cribado según la invención se pueden realizar *in vitro* o *in vivo*. Cuando estos métodos implican unos experimentos en animales modelos tales como ratas o ratones, estos animales son sacrificados al final de estos métodos. Así, estos métodos pueden comprender una etapa suplementaria de sacrificio de los animales modelos que se han utilizado eventualmente.

Utilización terapéutica de activadores de canales potásicos K2P

Debido a que la invalidación de los canales TREK-1 y TRAAK conduce a la disminución de los efectos analgésicos de la morfina sin afectar a los efectos indeseables tales como el efecto de estreñimiento y/o de depresor respiratorio, los activadores de los canales TREK-1 y TRAAK son unos analgésicos desprovistos de estos efectos indeseables de la morfina. Se describe también un activador de un canal potásico K2P de la familia TREK/TRAAK para una utilización en el tratamiento o la prevención del dolor. Unos activadores de este tipo son particularmente ventajosos para tratar o prevenir el dolor ya que están desprovistos de efecto de estreñimiento y/o de depresor respiratorio.

El dolor puede ser de diversas naturalezas. Puede ser agudo o crónico. Puede tratarse, por ejemplo, de un dolor post-operatorio, de un dolor asociado a una crisis hipeálgica, de un dolor asociado a un cáncer, de un dolor osteoarticular, de un dolor visceral o de un dolor neuropático, apareciendo dicho dolor en cualquier momento de la vida. En un modo de realización preferido, se trata de un dolor crónico, y más particularmente de un síndrome doloroso crónico tal como la fibromialgia, del intestino irritable o de un dolor *sine materia*. En otro modo de realización preferido, se trata de un dolor intestinal, estomacal o pulmonar, relacionado o no a un cáncer, tal como un dolor asociado a un cáncer colorrectal, a un cáncer del colón, a un cáncer de estómago, a la colitis ulcerosa, a la enfermedad inflamatoria crónica del intestino (designada mediante la abreviatura "MICI" o "IBD"), al intestino irritable, a un cáncer del pulmón o al asma.

El dolor se puede tratar en cualquier fase. Por "tratamiento" se entiende un tratamiento a título curativo (que pretende por lo menos aliviar, frenar o parar el dolor). Por "prevención" se entiende un tratamiento a título profiláctico (que pretende reducir el riesgo de aparición del dolor).

Los activadores pueden, por ejemplo, corresponder a unos ligantes naturales de un canal potásico K2P, a moléculas químicas, a aptámeros, a péptidos o a anticuerpos.

El activador puede por ejemplo corresponder a uno de los activadores de canales potásicos K2P ya conocidos en la técnica. Así, los canales de la familia TREK/TRAAK están abiertos de manera reversible por los lisofosfolípidos que poseen cabezas polares grandes (lisofosfatidilcolina, lisofosfatidilinositol) y por unos ácidos grasos poliinsaturados (ácido linolénico, ácido araquidónico) (Fink *et al.*, 1998 EMBO J. 17:3297-308). Unos ésteres del ácido cafeico, en particular el cinamil 1-3,4-dihidroxi- $\alpha$ -cianocinamato (CDC) y el ácido cafeico fenetiléster (CAPE), aumentan la corriente TREK-1 sobre las células bovinas adreno-fasciculares (Danthi *et al.*, 2004 Mol Pharmacol. 65:599-610). Finalmente, unos fenamatos tales como el ácido flufenámico, el ácido niflúmico y el ácido mefenámico activan los canales TREK-1, TREK-2 y TRAAK en unos sistemas de expresión heterólogos (Takahira *et al.*, 2005 Pflugers Arch. 451:474-8). Los compuestos específicamente mencionados anteriormente son unos ejemplos de activador.

Así, el activador se puede seleccionar por ejemplo de entre un lisofosfolípido, un ácido graso poliinsaturado, un éster del ácido cafeico o un fenamato.

Alternativamente, los activadores de canales potásicos K2P pueden ser aislados mediante los métodos de cribado descritos anteriormente en el párrafo titulado "utilización de los canales potásicos K2P como dianas".

Se describe también un método de fabricación de un medicamento que contiene un activador de un canal potásico K2P que comprende las etapas siguientes:

- a) producir dicho medicamento;
- b) medir el efecto analgésico de dicho medicamento, y, opcionalmente,
- c) medir el efecto de estreñimiento y/o de depresor respiratorio de dicho medicamento.

Un método de fabricación de este tipo, que permite ensayar la calidad de diferentes lotes de producción, es útil durante la producción industrial de medicamentos. Más particularmente, este método permite verificar que un lote dado de medicamento que contiene un activador de un canal potásico K2P presente un efecto analgésico, y no presente un efecto de estreñimiento y/o de depresor respiratorio. En la etapa (a), el medicamento puede ser producido mediante cualquier método conocido por el experto en la técnica. La producción de un medicamento de este tipo comprende típicamente la síntesis del activador de un canal potásico K2P, y después su formulación en un producto farmacéutico.

El medicamento se puede destinar a ser administrado mediante cualquier vía apropiada, por ejemplo oral, sublingual, nasal, bucal, transdérmica, intravenosa, sub-cutánea, intramuscular y/o rectal. En un medicamento, el principio activo (es decir el activador según la invención) está combinado con un vehículo farmacéuticamente aceptable (es decir cualquier disolvente, medio de dispersión, agente retardador de la absorción, etc., que no produce ninguna reacción secundaria, por ejemplo alérgica, en el ser humano o el animal). Los vehículos farmacéuticamente aceptables son bien conocidos por el experto en la materia, e incluyen los descritos en "Remington's Pharmaceutical Sciences" (Mack Publishing Company, Easton, USA, 1985).

Se describe también un método de tratamiento o de prevención del dolor, que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un activador de un canal potásico K2P a un individuo que lo necesita. El individuo es preferentemente un mamífero, más particularmente un ser humano. La dosis terapéutica eficaz puede ser fácilmente determinada por el experto en la materia.

Se describe además la utilización de un activador de un canal potásico K2P para la preparación de un medicamento para tratar o prevenir el dolor.

Los ejemplos y figuras siguientes ilustran la invención sin limitar su alcance.

### Descripción de las figuras

**Figura 1:** en el estado basal, los animales knock-out (KO) muestran una hipersensibilidad al ensayo mecánico de von Frey (A) o al ensayo térmico (B) con respecto a los animales salvajes (WT) (WT frente a KO: ensayo de la t de Student: \*, P<0,05, \*\*, P<0,01, \*\*\*, P<0,001, n=8/15 por grupo).

**Figura 2:** Efecto de la dosis de morfina en el ensayo mecánico de von Frey (A) o el ensayo térmico de inmersión de la cola en agua a 46°C (B) en los animales salvajes y TREK-1<sup>-/-</sup>. Los resultados son expresados en variaciones de umbrales nociceptivos con respecto a los valores de los ratones de mismo genotipo tratados por el vehículo. Sea cual sea el ensayo utilizado, el análisis estadístico muestra globalmente un efecto-dosis de la morfina (F=153,3, P<0,001; F=17,5, P<0,001) y un efecto genotipo (F=143,2, P<0,001; F=14,2, P<0,001). El efecto analgésico de la morfina está disminuido en los ratones TREK-1<sup>-/-</sup> con respecto a los animales salvajes (Anova de dos vías, *post hoc* Student Newman Keuls; \*\*\*, P<0,001, n=6/9 por dosis y por genotipo).

**Figura 3:** (A) Cantidad de heces acumuladas en las dos horas siguientes a la inyección de vehículo o de morfina (1; 3; o 5 mg/kg, s.c.) en los animales salvajes y TREK-1<sup>-/-</sup>. El análisis estadístico muestra globalmente un efecto-dosis de la morfina (P<0,001) pero ningún efecto del genotipo (n=5/6 por dosis y genotipo). (B) Depresión respiratoria inducida por dosis crecientes de morfina (5; 10; 20 o 50 mg/kg, s.c.) en los animales salvajes y TREK-1<sup>-/-</sup>. El análisis estadístico muestra globalmente un efecto-dosis de la morfina (P<0,001) pero ningún efecto del genotipo (n=6/8 por dosis y genotipo).

**Figura 4:** Efecto antinociceptivo de la morfina (5 mg/kg, s.c.) en el ensayo mecánico de von Frey (A) y el ensayo térmico de inmersión de la cola en agua a 46°C (B) en los animales salvajes y TRAAK<sup>-/-</sup>. Los resultados son expresados en variaciones de umbrales nociceptivos con respecto a los valores de los ratones del mismo genotipo tratados por el vehículo. Sea cual sea el ensayo utilizado, el análisis estadístico muestra que el efecto analgésico de la morfina está disminuido en los ratones TRAAK<sup>-/-</sup> con respecto a los animales salvajes (ensayo de la t de Student: \*\*\*, P<0,001, n=12/14 por grupo). (C) Cantidad de heces acumuladas en las dos horas siguientes a la inyección de vehículo o de morfina (5 mg/kg, s.c.) en los animales salvajes y TRAAK<sup>-/-</sup> (n=6 por dosis y genotipo).

### Descripción de las secuencias del listado de secuencias

SEC ID nº 1 corresponde a la secuencia de una sub-unidad de un canal TREK-1.

SEC ID nº 2 corresponde a la secuencia de una sub-unidad de un canal TREK-2.

SEC ID nº 3 corresponde a la secuencia de una sub-unidad de un canal TRAAK.

### Ejemplos

#### Ejemplo 1: Protocolos

##### Animales

Se colocaron unos ratones machos C57Bl/6J (Charles River Lab, Francia), TREK-1<sup>-/-</sup>, TREK-2<sup>-/-</sup> y TRAAK<sup>-/-</sup> (IPMC, Nice Sophia Antipolis), que pesan de 20 a 30 gramos, en una jaula con comida y agua *ad libitum* en un entorno termorregulado a 22°C con un ciclo día/noche de 12h/12h. Los detalles referentes a la generación de los animales KO se han descrito anteriormente (Heurteaux *et al.*, 2004 EMBO J. 23:2684-95; Guyon *et al.*, 2009 J. Neurosc. 29:2528-33). Los experimentos se realizaron a ciegas en una habitación tranquila por el mismo experimentador teniendo cuidado de respetar las exigencias reglamentarias sobre el experimento animal.

##### Moléculas

Se han utilizado las moléculas siguientes: clorhidrato de morfina (Cooper, Melun, Francia), clorhidrato de naloxona (Sigma Chemical Co., St Louis, MO). Las soluciones se prepararon extemporáneamente en NaCl (0,9%). La naloxona (1 mg/kg, s.c.) se administró 15 minutos antes de la inyección de morfina o de vehículo.

##### Ensayos de nocicepción

Los ensayos utilizados comprendían unos ensayos que utilizan unos estímulos térmicos (ensayo de inmersión de la cola en agua caliente a 46°C) y mecánicos (sensibilidad mecánica al ensayo de los filamentos de von Frey). La sensibilidad térmica se mide mediante el ensayo de inmersión de la cola en agua a una temperatura nociceptiva de 46°C (Janssen *et al.*, 1963 *Arzneimittelforschung*. 13:502-7). El animal se sujeta manualmente y se sumerge la cola en un baño maría hasta que el animal la retire o hasta el "cut off", fijado en 30 s. El umbral basal (pretratamiento) se define por la media de los dos primeros tiempos de latencia, que no difieren en más de un segundo. Los animales se acostumbraron a la contención durante una semana antes de empezar el experimento. La sensibilidad mecánica se mide mediante la aplicación de filamentos de von Frey (Bioseb) de fuerza creciente (0,01 a 2 g) debajo de las patas del animal (Tal y Bennett, 1994 *Pain*. 57:375-82). Los animales son colocados en unas cajas (85 x 35 mm, separación opaca entre los ratones, fondo con rejilla para acceder al arco plantar) 20 minutos antes del ensayo, para acostumbrarlos. Los filamentos son apoyados perpendicularmente debajo de la pata trasera derecha de los ratones hasta que se curven. Esta operación se repite cinco veces, antes de pasar al filamento siguiente en caso de que no se haya obtenido ninguna reacción. Cuando la presión ejercida corresponde al umbral de sensibilidad táctil del animal, éste tiene una reacción de retirada de la pata equivalente a una contracción refleja. El valor de presión del filamento es entonces retenido como valor umbral.

#### Tránsito intestinal

La evaluación del tránsito intestinal se ha realizado utilizando un método global de recogida de las heces en cinética durante 2 horas tras la inyección de morfina o de vehículo (NaCl 0,9%). Los animales son colocados en unas cajas (85 x 35 mm, separación opaca entre los ratones, fondo con rejilla para la recogida de las heces) 20 minutos antes del ensayo, para que se habitúen. Las heces son recogidas y pesadas inmediatamente después de la recogida, cada hora durante 2 horas tras la inyección de morfina o de vehículo.

#### Medición de la frecuencia respiratoria

La frecuencia respiratoria se ha medido de manera no invasiva (Drorbaugh y Fenn, 1955 *Pediatrics*. 16:81-7; Matthes *et al.*, 1998 *J Neurosci*. 18:7285-95) utilizando un pletismógrafo barométrico (Emka Technologies, VA, USA) que comprende 8 cámaras que permiten la medición en paralelo sobre varios animales. El programa IOX (Emka Technologies, VA, USA) se utilizó para el cálculo de la frecuencia respiratoria. Se administró cada dosis de morfina o de vehículo y se evaluaron sus efectos sobre la frecuencia respiratoria en cuatro ratones salvajes y cuatro ratones TREK-1<sup>-/-</sup> en paralelo. Los animales se habituaron a las cámaras durante 15 minutos antes de la inyección. El análisis de la frecuencia respiratoria durante este periodo de 15 minutos reveló una frecuencia respiratoria estable. Se utilizó por lo tanto la media de la frecuencia respiratoria durante este periodo para normalizar el efecto de la morfina o del vehículo sobre la frecuencia respiratoria durante el periodo del ensayo (90 minutos).

#### Análisis estadísticos

Los datos experimentales se analizaron utilizando el programa Sigma STAT, versión 3.0 para Windows (STAT32 Software Inc., San Diego, California).

#### **Ejemplo 2: Papel de los canales TREK-1, TREK-2 y TRAAK en la fisiología de la nocicepción**

Sea cual sea el ensayo utilizado, el ensayo de sensibilidad mecánica de von Frey (figura 1A) o el ensayo térmico de inmersión de la cola en agua caliente a 46°C (figura 1B), se ha demostrado que los animales TREK-1<sup>-/-</sup> o TRAAK<sup>-/-</sup> tienen unos umbrales de dolor significativamente más bajos que los animales salvajes. Se ha demostrado igualmente que los umbrales de dolor de los animales TREK-2<sup>-/-</sup> son significativamente más bajos que los de los animales salvajes (figura 1A y 1B).

#### **Ejemplo 3: Papel de los canales TREK-1 en la acción analgésica de la morfina**

Al tener los animales TREK-1<sup>-/-</sup> unos umbrales de dolor, antes de la inyección de morfina o de vehículo, significativamente más bajos que los de los animales salvajes (figura 1A y 1B), las diferencias entre los valores pre- y post-inyección se han calculado, y después comparado, para cada animal.

El análisis estadístico de los datos, utilizando un Anova de dos vías, hizo aparecer los efectos principales para la morfina ( $F = 153,3$ ;  $p < 0,001$ ;  $F = 17,5$ ;  $p < 0,001$ ) y el genotipo ( $F = 143,2$ ;  $p < 0,001$ ;  $F = 14,2$ ;  $p < 0,001$ ), respectivamente para los ensayos térmicos y mecánicos. Además, aunque la morfina aumenta los tiempos de latencia de la retirada de la cola en el agua caliente a 46°C y los umbrales de dolor mecánico en los dos genotipos, estos efectos analgésicos de la morfina están disminuidos muy significativamente en los animales TREK-1<sup>-/-</sup> con respecto a los animales salvajes (figura 2A y 2B).

En conclusión, esto demuestra que los canales TREK-1 están implicados en el efecto analgésico de la morfina.

#### **Ejemplo 4: Influencia de la deleción de los canales TREK-1 sobre el estreñimiento inducido por la morfina**



Los receptores opioides son unos agentes claves en la inhibición del tránsito gastrointestinal inducida por la morfina (Reisine y Pasternak, 1996, "The Pharmacological Basis of Therapeutics", Editores: Hardman JG, Gilman AG, y Limbird, páginas 521-555).

Se ha estudiado por lo tanto el impacto de la morfina sobre el tránsito de animales TREK-1<sup>-/-</sup> con el objetivo de evaluar la influencia de la delección de este efecto indeseable. Los efectos de la morfina sobre las funciones gastrointestinales se evaluaron mediante la medición de la producción de heces recogidas cada hora durante 2 horas después de la inyección de morfina o del vehículo. Para asegurarse de que los dos genotipos no difieren en su consumo de alimento y agua, este consumo se midió y normalizó por animal (conteniendo las jaulas de 3 a 5 animales) y los datos medios para 3 jaulas por genotipo.

En ausencia de tratamiento por morfina, no se ha observado ninguna diferencia (consumo de alimento: animales salvajes, 3,17 ± 0,23; TREK-1<sup>-/-</sup>, 3,21 ± 0,14 g/animal/24h; consumo de agua: animales salvajes, 3,69 ± 0,41; TREK-1<sup>-/-</sup>, 4,03 ± 0,05 ml/animal/24h). El tratamiento por el vehículo ha dado un perfil de producción fecal idéntico en los dos genotipos, lo cual sugiere que los dos genotipos no difieren en su función gastrointestinal en condición normal. La morfina induce una disminución de la defecación comparable en los dos genotipos durante el periodo ensayado con respecto al tratamiento con el vehículo (figura 3A).

Este experimento demuestra que los canales TREK-1 no están implicados en el efecto de estreñimiento de la morfina.

**Ejemplo 5: Influencia de la delección de los canales TREK-1 sobre la depresión respiratoria inducida por la morfina**

Entre los efectos indeseables de la morfina, el más perjudicial es seguramente la depresión respiratoria, que puede causar la muerte en los casos de sobredosis. La depresión respiratoria inducida por la morfina se produce también por medio de la activación de los receptores opioides (Santiago y Edelman, 1985 J Appl Physiol. 59:1675-85; Reisine and Pasternak, 1996, "The Pharmacological Basis of Therapeutics", editores: Hardman JG, Gilman AG, y Limbird, páginas 521-555), además, los ratones cuyo gen codifica el receptor  $\mu$  está invalidado están protegidos frente a este efecto indeseable (Matthes *et al.*, 1998 J Neurosci. 18:7285-95; Dahan *et al.*, 2001 Anesthesiology. 94:824-32; Romberg *et al.*, 2003 Br J Anaesth. 91:862-70). Con el fin de determinar si la depresión respiratoria inducida por la morfina está alterada por la delección del gen que codifica los canales TREK-1, se ha medido la frecuencia respiratoria de los animales salvajes y TREK-1<sup>-/-</sup> utilizando un pletismógrafo barométrico después de la inyección de morfina o de vehículo.

La frecuencia respiratoria basal no es diferente en los dos genotipos. Además, sea cual sea el genotipo, ni el vehículo ni la morfina a la dosis de 5 mg/kg influyen en la frecuencia respiratoria. Sin embargo, sea cual sea el genotipo, la administración de morfina a las dosis 10, 20 y 50 mg/kg provoca una disminución de la frecuencia respiratoria dosis-dependiente sin diferencia entre los genotipos (figura 3B).

La delección del gen que codifica para TREK-1 no reduce el efecto depresor respiratorio de la morfina. El canal TREK-1 no está por lo tanto implicado este efecto indeseable.

**Ejemplo 5: Papel de los canales TRAAK en la acción analgésica y el efecto de estreñimiento de la morfina**

Con el fin de ensayar la hipótesis de la implicación de los canales TRAAK en la acción analgésica de la morfina, se utilizaron unos ratones salvajes y knock-out para los canales TRAAK (TRAAK<sup>-/-</sup>), y se midieron los efectos de la morfina a la dosis de 5 mg/kg inyectada por vía subcutánea.

Sea cual sea el ensayo utilizado, el ensayo de sensibilidad mecánica de von Frey o el ensayo térmico de inmersión de la cola en el agua caliente a 46°C, se ha encontrado que los animales TRAAK<sup>-/-</sup> tienen unos umbrales de dolor, antes de la inyección de morfina o de vehículo, significativamente más bajos que los de los animales salvajes (figura 1A y 1B).

Los valores después de la inyección de morfina o de vehículo se midieron después, y se calcularon las diferencias ente los valores pre- y post-inyección para cada animal. El análisis estadístico de los datos, utilizando un ensayo de la t de Student hizo parecer que el efecto analgésico de la morfina era significativamente disminuido en los animales TRAAK<sup>-/-</sup> con respecto a los animales salvajes (figura 4A y 4B).

Este resultado muestra que los canales TRAAK están también implicados en el efecto analgésico de la morfina.

Se estudió también el estreñimiento inducido por la morfina en los animales TRAAK<sup>-/-</sup>. Los efectos de la morfina sobre las funciones gastrointestinales se evaluaron mediante la medición de la producción de heces recogidas cada hora durante 2 horas después de la inyección de la morfina o del vehículo. Para asegurarse de que los dos genotipos no difieren en su consumo de alimento y de agua, se midió este consumo y se normalizó por animal

(conteniendo las jaulas de 3 a 5 animales) y los datos medios para 3 jaulas por genotipo.

5 En ausencia de tratamiento por morfina, no se ha observado ninguna diferencia (consumo de alimento: animales salvajes,  $3,17 \pm 0,23$ ; TRAAK<sup>-/-</sup>,  $3,58 \pm 0,52$  g/animal/24h; consumo de agua: animales salvajes,  $3,69 \pm 0,41$ ; TRAAK<sup>-/-</sup>,  $4,25 \pm 0,48$  ml/animal/24h). El tratamiento por el vehículo ha dado un perfil de producción fecal idéntico en los dos genotipos, lo cual sugiere que los dos genotipos no difieren en su función gastrointestinal en condición normal. La morfina induce una disminución de la defecación comparable en los dos genotipos durante el periodo ensayado con respecto al tratamiento con el vehículo (figura 4C).

10 Este resultado demuestra que los canales TRAAK no están implicados en el efecto de estreñimiento de la morfina.

**Listado de secuencias**

- 15 <110> UNIVERSITE D'AUVERGNE CLERMONT I
- <120> Utilización de activadores de canales potásicos TREK-1, TREK-2 o TRAAR como analgésicos
- <130> BFF 09A0386
- 20 <160> 3
- <170> PatentIn versión 3.4
- <210> 1
- <211> 426
- 25 <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <220>
- <221> VARSPLIC
- 30 <222> (1)..(16)
- <223> MLPSASRERPGYRAGV -> MMNPRAKRDFYL (en isoforma 3)
- <220>
- <221> VARSPLIC
- 35 <222> (2)..(16)
- <223> Ausente (en isoforma\_2)
- <400> 1

ES 2 517 925 T3

Met Leu Pro Ser Ala Ser Arg Glu Arg Pro Gly Tyr Arg Ala Gly Val  
 1 5 10 15

Ala Ala Pro Asp Leu Leu Asp Pro Lys Ser Ala Ala Gln Asn Ser Lys  
 20 25 30

Pro Arg Leu Ser Phe Ser Thr Lys Pro Thr Val Leu Ala Ser Arg Val  
 35 40 45

Glu Ser Asp Thr Thr Ile Asn Val Met Lys Trp Lys Thr Val Ser Thr  
 50 55 60

Ile Phe Leu Val Val Val Leu Tyr Leu Ile Ile Gly Ala Thr Val Phe  
 65 70 75 80

Lys Ala Leu Glu Gln Pro His Glu Ile Ser Gln Arg Thr Thr Ile Val  
 85 90 95

Ile Gln Lys Gln Thr Phe Ile Ser Gln His Ser Cys Val Asn Ser Thr  
 100 105 110

Glu Leu Asp Glu Leu Ile Gln Gln Ile Val Ala Ala Ile Asn Ala Gly  
 115 120 125

Ile Ile Pro Leu Gly Asn Thr Ser Asn Gln Ile Ser His Trp Asp Leu  
 130 135 140

ES 2 517 925 T3

Gly Ser Ser Phe Phe Phe Ala Gly Thr Val Ile Thr Thr Ile Gly Phe  
145 150 155 160

Gly Asn Ile Ser Pro Arg Thr Glu Gly Gly Lys Ile Phe Cys Ile Ile  
165 170 175

Tyr Ala Leu Leu Gly Ile Pro Leu Phe Gly Phe Leu Leu Ala Gly Val  
180 185 190

Gly Asp Gln Leu Gly Thr Ile Phe Gly Lys Gly Ile Ala Lys Val Glu  
195 200 205

Asp Thr Phe Ile Lys Trp Asn Val Ser Gln Thr Lys Ile Arg Ile Ile  
210 215 220

Ser Thr Ile Ile Phe Ile Leu Phe Gly Cys Val Leu Phe Val Ala Leu  
225 230 235 240

Pro Ala Ile Ile Phe Lys His Ile Glu Gly Trp Ser Ala Leu Asp Ala  
245 250 255

Ile Tyr Phe Val Val Ile Thr Leu Thr Thr Ile Gly Phe Gly Asp Tyr  
260 265 270

Val Ala Gly Gly Ser Asp Ile Glu Tyr Leu Asp Phe Tyr Lys Pro Val  
275 280 285

Val Trp Phe Trp Ile Leu Val Gly Leu Ala Tyr Phe Ala Ala Val Leu  
290 295 300

Ser Met Ile Gly Asp Trp Leu Arg Val Ile Ser Lys Lys Thr Lys Glu  
305 310 315 320

Glu Val Gly Glu Phe Arg Ala His Ala Ala Glu Trp Thr Ala Asn Val  
325 330 335

Thr Ala Glu Phe Lys Glu Thr Arg Arg Arg Leu Ser Val Glu Ile Tyr  
340 345 350

Asp Lys Phe Gln Arg Ala Thr Ser Ile Lys Arg Lys Leu Ser Ala Glu  
355 360 365

Leu Ala Gly Asn His Asn Gln Glu Leu Thr Pro Cys Arg Arg Thr Leu  
370 375 380

Ser Val Asn His Leu Thr Ser Glu Arg Asp Val Leu Pro Pro Leu Leu  
385 390 395 400

Lys Thr Glu Ser Ile Tyr Leu Asn Gly Leu Thr Pro His Cys Ala Gly  
405 410 415

Glu Glu Ile Ala Val Ile Glu Asn Ile Lys  
420 425

5 <210> 2  
<211> 538  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

ES 2 517 925 T3

<220>

<221> VARSPLIC

<222> (1)..(12)

5 <223> MFFLYTDFFLSL -> MKGDRTEGCRSDS (en isoforma B)

<220>

<221> VARSPLIC

<222> (1)..(12)

10 <223> MFFLYTDFFLSL -> MKFPIETPRKQVNWDPK (en isoforma C)

<220>

<221> VARIANT

<222> (512)..(512)

15 <223> Sustitución de A por T

<400> 2

Met Phe Phe Leu Tyr Thr Asp Phe Phe Leu Ser Leu Val Ala Val Pro  
1 5 10 15

Ala Ala Ala Pro Val Cys Gln Pro Lys Ser Ala Thr Asn Gly Gln Pro  
20 25 30

Pro Ala Pro Ala Pro Thr Pro Thr Pro Arg Leu Ser Ile Ser Ser Arg  
35 40 45

Ala Thr Val Val Ala Arg Met Glu Gly Thr Ser Gln Gly Gly Leu Gln  
50 55 60

Thr Val Met Lys Trp Lys Thr Val Val Ala Ile Phe Val Val Val Val  
65 70 75 80

Val Tyr Leu Val Thr Gly Gly Leu Val Phe Arg Ala Leu Glu Gln Pro  
85 90 95

Phe Glu Ser Ser Gln Lys Asn Thr Ile Ala Leu Glu Lys Ala Glu Phe  
100 105 110

Leu Arg Asp His Val Cys Val Ser Pro Gln Glu Leu Glu Thr Leu Ile  
115 120 125

Gln His Ala Leu Asp Ala Asp Asn Ala Gly Val Ser Pro Ile Gly Asn

20

ES 2 517 925 T3

130					135					140					
Ser	Ser	Asn	Asn	Ser	Ser	His	Trp	Asp	Leu	Gly	Ser	Ala	Phe	Phe	Phe
145					150					155					160
Ala	Gly	Thr	Val	Ile	Thr	Thr	Ile	Gly	Tyr	Gly	Asn	Ile	Ala	Pro	Ser
				165					170					175	
Thr	Glu	Gly	Gly	Lys	Ile	Phe	Cys	Ile	Leu	Tyr	Ala	Ile	Phe	Gly	Ile
			180					185					190		
Pro	Leu	Phe	Gly	Phe	Leu	Leu	Ala	Gly	Ile	Gly	Asp	Gln	Leu	Gly	Thr
		195					200					205			
Ile	Phe	Gly	Lys	Ser	Ile	Ala	Arg	Val	Glu	Lys	Val	Phe	Arg	Lys	Lys
	210					215					220				
Gln	Val	Ser	Gln	Thr	Lys	Ile	Arg	Val	Ile	Ser	Thr	Ile	Leu	Phe	Ile
225					230					235					240
Leu	Ala	Gly	Cys	Ile	Val	Phe	Val	Thr	Ile	Pro	Ala	Val	Ile	Phe	Lys
				245					250					255	
Tyr	Ile	Glu	Gly	Trp	Thr	Ala	Leu	Glu	Ser	Ile	Tyr	Phe	Val	Val	Val
			260					265					270		
Thr	Leu	Thr	Thr	Val	Gly	Phe	Gly	Asp	Phe	Val	Ala	Gly	Gly	Asn	Ala
		275					280					285			
Gly	Ile	Asn	Tyr	Arg	Glu	Trp	Tyr	Lys	Pro	Leu	Val	Trp	Phe	Trp	Ile
	290					295					300				
Leu	Val	Gly	Leu	Ala	Tyr	Phe	Ala	Ala	Val	Leu	Ser	Met	Ile	Gly	Asp
305					310					315					320
Trp	Leu	Arg	Val	Leu	Ser	Lys	Lys	Thr	Lys	Glu	Glu	Val	Gly	Glu	Ile
				325					330					335	
Lys	Ala	His	Ala	Ala	Glu	Trp	Lys	Ala	Asn	Val	Thr	Ala	Glu	Phe	Arg
			340					345					350		
Glu	Thr	Arg	Arg	Arg	Leu	Ser	Val	Glu	Ile	His	Asp	Lys	Leu	Gln	Arg
		355					360					365			
Ala	Ala	Thr	Ile	Arg	Ser	Met	Glu	Arg	Arg	Arg	Leu	Gly	Leu	Asp	Gln
	370					375					380				
Arg	Ala	His	Ser	Leu	Asp	Met	Leu	Ser	Pro	Glu	Lys	Arg	Ser	Val	Phe
385					390					395					400

ES 2 517 925 T3

Ala Ala Leu Asp Thr Gly Arg Phe Lys Ala Ser Ser Gln Glu Ser Ile  
 405 410 415

Asn Asn Arg Pro Asn Asn Leu Arg Leu Lys Gly Pro Glu Gln Leu Asn  
 420 425 430

Lys His Gly Gln Gly Ala Ser Glu Asp Asn Ile Ile Asn Lys Phe Gly  
 435 440 445

Ser Thr Ser Arg Leu Thr Lys Arg Lys Asn Lys Asp Leu Lys Lys Thr  
 450 455 460

Leu Pro Glu Asp Val Gln Lys Ile Tyr Lys Thr Phe Arg Asn Tyr Ser  
 465 470 475 480

Leu Asp Glu Glu Lys Lys Glu Glu Glu Thr Glu Lys Met Cys Asn Ser  
 485 490 495

Asp Asn Ser Ser Thr Ala Met Leu Thr Asp Cys Ile Gln Gln His Ala  
 500 505 510

Glu Leu Glu Asn Gly Met Ile Pro Thr Asp Thr Lys Asp Arg Glu Pro  
 515 520 525

Glu Asn Asn Ser Leu Leu Glu Asp Arg Asn  
 530 535

<210> 3  
 <211> 393  
 <212> PRT  
 5 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> VARSPLIC  
 <222> (1)..(1)  
 10 <223> M -> MTTAPQEPPARPLQAGSGAG PAPGRAM (en isoforma 2)

<220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (328)..(328)  
 15 <223> Sustitución de P por L

<400> 3

Met Arg Ser Thr Thr Leu Leu Ala Leu Leu Ala Leu Val Leu Leu Tyr  
 1 5 10 15

Leu Val Ser Gly Ala Leu Val Phe Arg Ala Leu Glu Gln Pro His Glu  
 20 25 30

Gln Gln Ala Gln Arg Glu Leu Gly Glu Val Arg Glu Lys Phe Leu Arg

20

ES 2 517 925 T3

35	40	45																			
Ala	His	Pro	Cys	Val	Ser	Asp	Gln	Glu	Leu	Gly	Leu	Leu	Ile	Lys	Glu						
50						55					60										
Val	Ala	Asp	Ala	Leu	Gly	Gly	Gly	Ala	Asp	Pro	Glu	Thr	Asn	Ser	Thr						
65					70					75					80						
Ser	Asn	Ser	Ser	His	Ser	Ala	Trp	Asp	Leu	Gly	Ser	Ala	Phe	Phe	Phe						
				85					90					95							
Ser	Gly	Thr	Ile	Ile	Thr	Thr	Ile	Gly	Tyr	Gly	Asn	Val	Ala	Leu	Arg						
			100					105					110								
Thr	Asp	Ala	Gly	Arg	Leu	Phe	Cys	Ile	Phe	Tyr	Ala	Leu	Val	Gly	Ile						
		115					120					125									
Pro	Leu	Phe	Gly	Ile	Leu	Leu	Ala	Gly	Val	Gly	Asp	Arg	Leu	Gly	Ser						
130							135				140										
Ser	Leu	Arg	His	Gly	Ile	Gly	His	Ile	Glu	Ala	Ile	Phe	Leu	Lys	Trp						
145					150					155					160						
His	Val	Pro	Pro	Glu	Leu	Val	Arg	Val	Leu	Ser	Ala	Met	Leu	Phe	Leu						
				165					170					175							
Leu	Ile	Gly	Cys	Leu	Leu	Phe	Val	Leu	Thr	Pro	Thr	Phe	Val	Phe	Cys						
			180					185					190								
Tyr	Met	Glu	Asp	Trp	Ser	Lys	Leu	Glu	Ala	Ile	Tyr	Phe	Val	Ile	Val						
		195					200					205									
Thr	Leu	Thr	Thr	Val	Gly	Phe	Gly	Asp	Tyr	Val	Ala	Gly	Ala	Asp	Pro						
	210					215						220									
Arg	Gln	Asp	Ser	Pro	Ala	Tyr	Gln	Pro	Leu	Val	Trp	Phe	Trp	Ile	Leu						
225					230					235					240						
Leu	Gly	Leu	Ala	Tyr	Phe	Ala	Ser	Val	Leu	Thr	Thr	Ile	Gly	Asn	Trp						
				245					250					255							
Leu	Arg	Val	Val	Ser	Arg	Arg	Thr	Arg	Ala	Glu	Met	Gly	Gly	Leu	Thr						
			260					265						270							
Ala	Gln	Ala	Ala	Ser	Trp	Thr	Gly	Thr	Val	Thr	Ala	Arg	Val	Thr	Gln						
		275					280						285								
Arg	Ala	Gly	Pro	Ala	Ala	Pro	Pro	Pro	Glu	Lys	Glu	Gln	Pro	Leu	Leu						
290						295					300										



ES 2 517 925 T3

Pro Pro Pro Pro Cys Pro Ala Gln Pro Leu Gly Arg Pro Arg Ser Pro  
305 310 315 320

Ser Pro Pro Glu Lys Ala Gln Pro Pro Ser Pro Pro Thr Ala Ser Ala  
325 330 335

Leu Asp Tyr Pro Ser Glu Asn Leu Ala Phe Ile Asp Glu Ser Ser Asp  
340 345 350

Thr Gln Ser Glu Arg Gly Cys Pro Leu Pro Arg Ala Pro Arg Gly Arg  
355 360 365

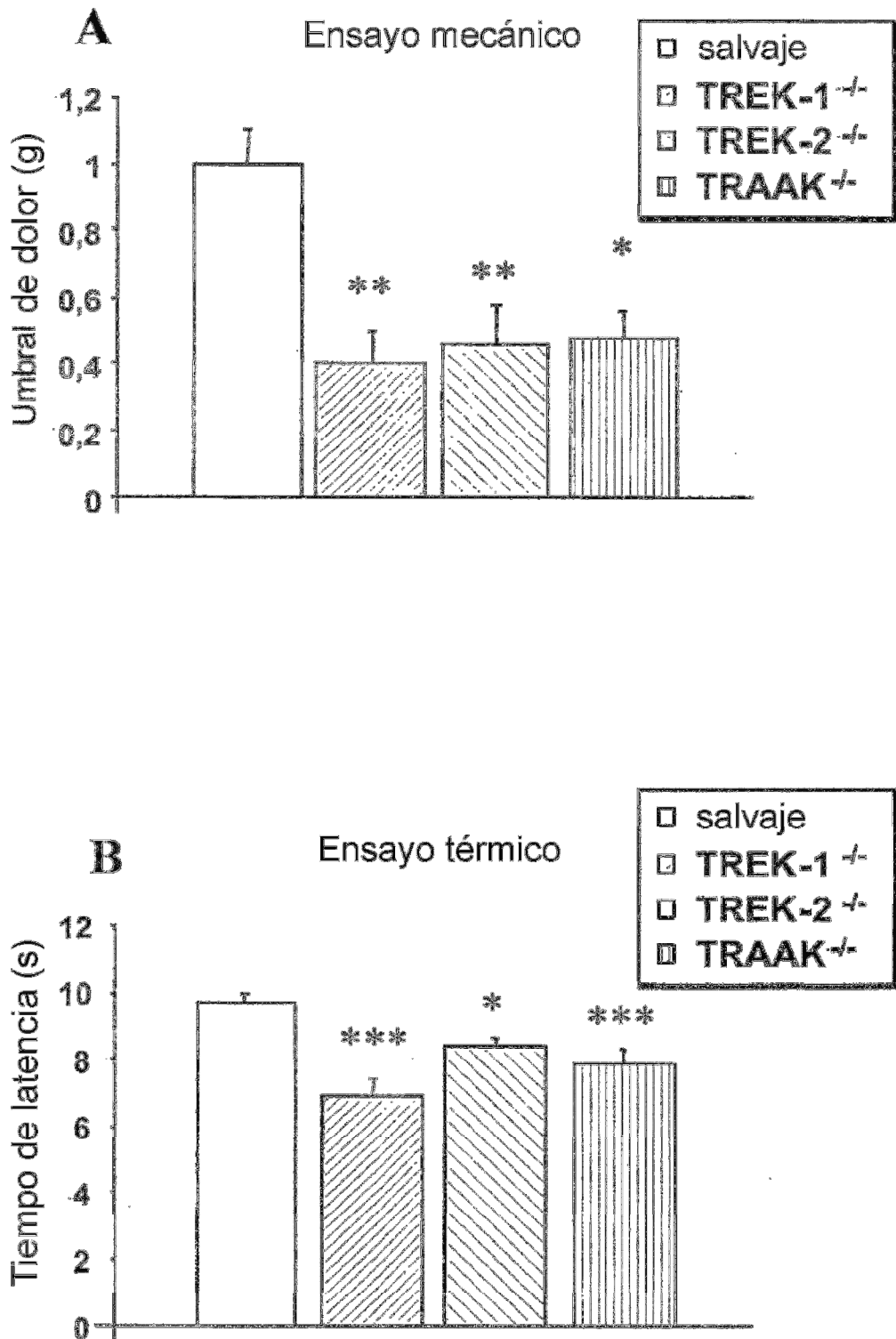
Arg Arg Pro Asn Pro Pro Arg Lys Pro Val Arg Pro Arg Gly Pro Gly  
370 375 380

Arg Pro Arg Asp Lys Gly Val Pro Val  
385 390

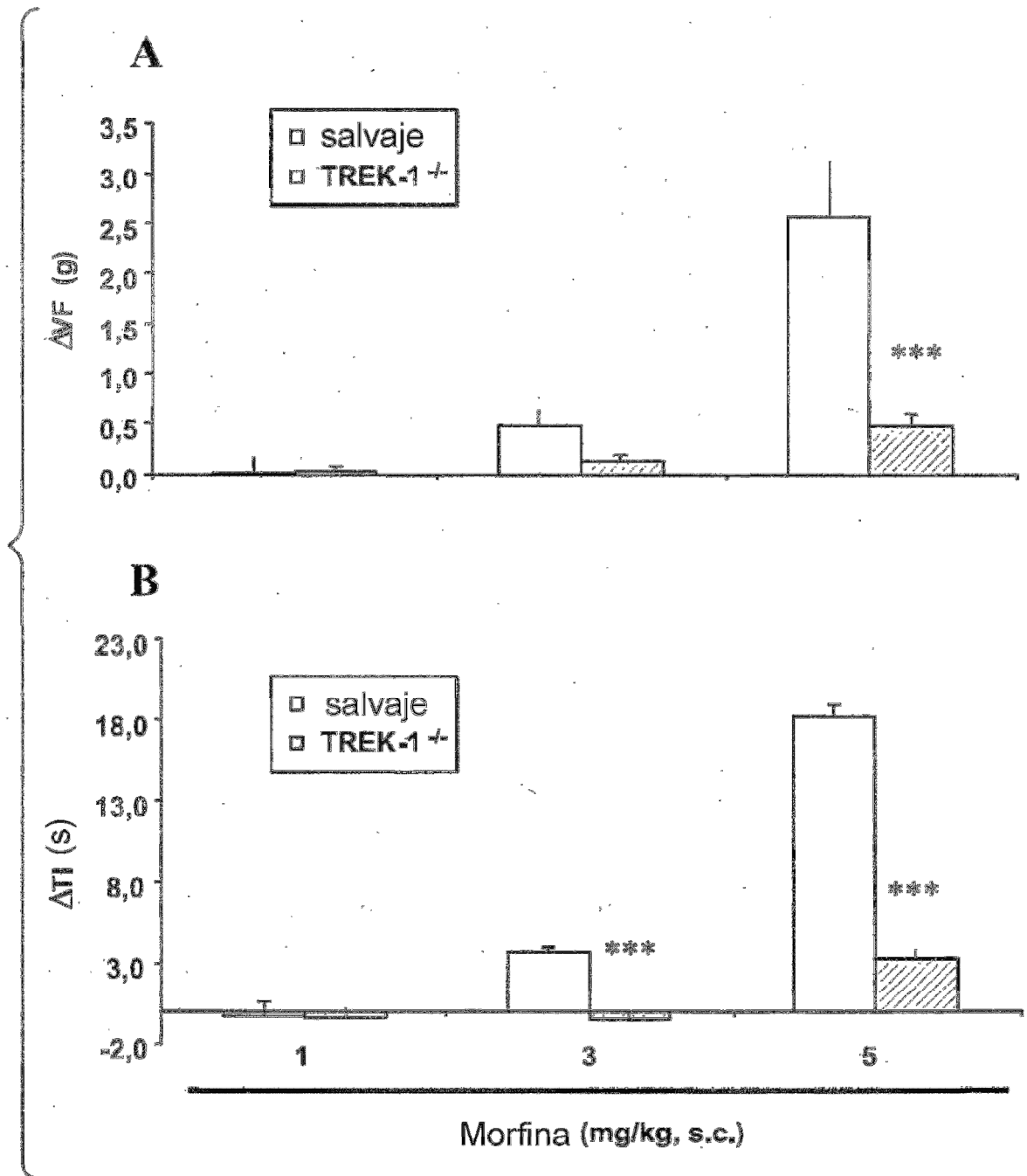
---

**REIVINDICACIONES**

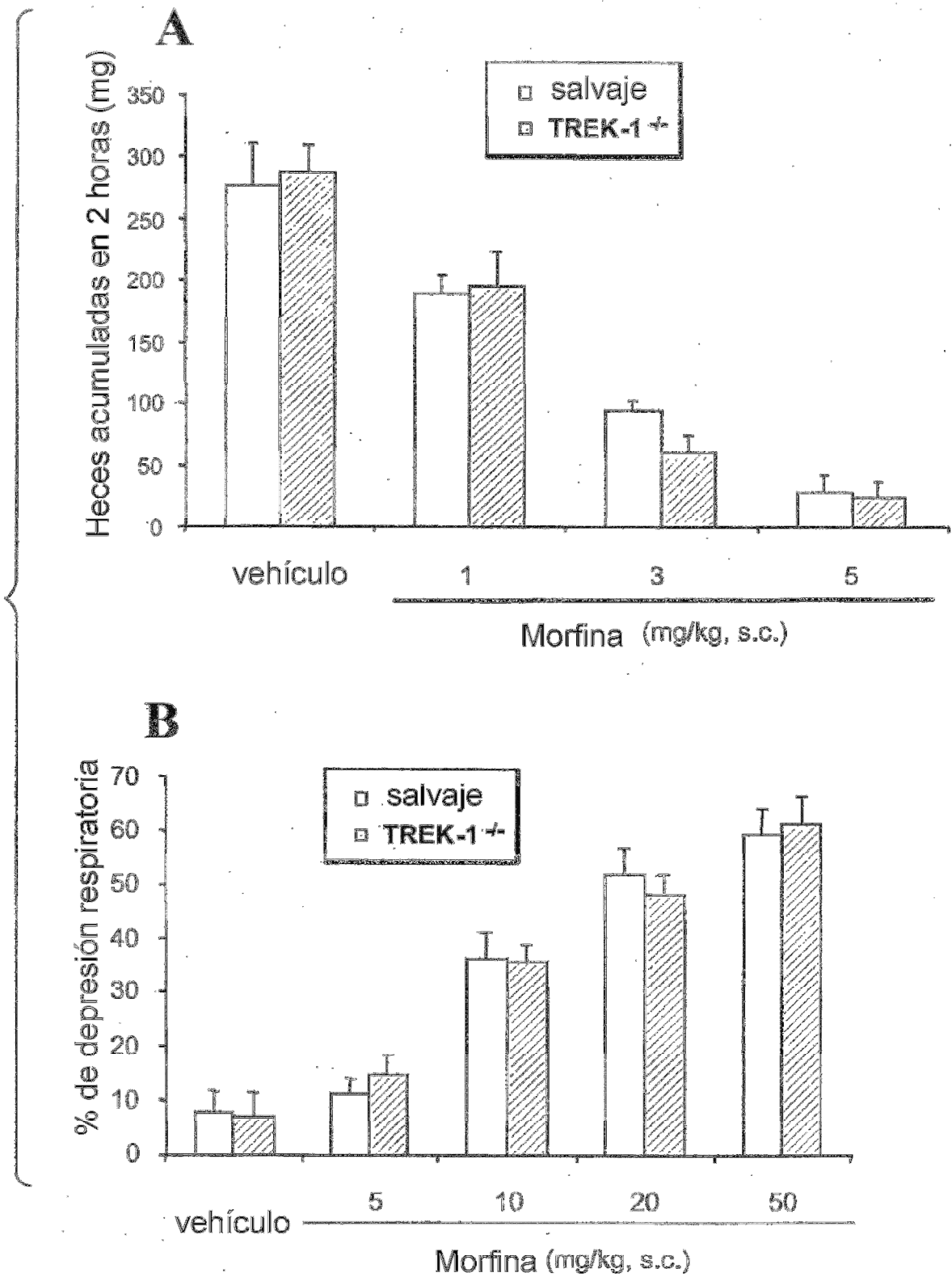
- 5 1. Método de cribado para la identificación de un compuesto analgésico desprovisto de efecto de estreñimiento y/o de depresor respiratorio que comprende las etapas siguientes:
- a) proporcionar un compuesto candidato;
  - b) determinar si dicho compuesto candidato activa un canal potásico seleccionado de entre TREK-1, TRAAK y TREK-2;
- 10 que comprende además la etapa de medición del efecto analgésico de dicho compuesto candidato que activa dicho canal potásico, *in vivo* en animales modelos no humanos, y la etapa de medir el efecto de estreñimiento y/o de depresor respiratorio de dicho compuesto que activa dicho canal potásico, *in vivo* en animales modelos no humanos.
- 15 2. Método de cribado según la reivindicación 1, que comprende además la selección de un compuesto analgésico sin efecto de estreñimiento y/o de depresor respiratorio.
3. Método de cribado para la identificación de un compuesto analgésico desprovisto de efecto de estreñimiento y/o de depresor respiratorio que comprende las etapas siguientes:
- 20 a) identificar un activador de un canal potásico seleccionado de entre TREK-1, TRAAK y TREK-2 por cribado de compuestos candidatos;
  - b) medir el efecto analgésico de dicho activador; y
  - 25 c) medir el efecto de estreñimiento y/o de depresor respiratorio de dicho activador.
4. Método de cribado según la reivindicación 3, que comprende además la selección de un compuesto analgésico sin efecto de estreñimiento y/o de depresor respiratorio.
- 30 5. Utilización de un canal potásico seleccionado de entre TREK-1, TRAAK y TREK-2 como diana para identificar un compuesto analgésico desprovisto de efecto de estreñimiento y/o de depresor respiratorio durante un cribado de compuestos candidatos.
- 35 6. Utilización según la reivindicación 5, en la que dicho compuesto analgésico es un activador de dicho canal potásico.
- 40 7. Método de cribado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o utilización según la reivindicación 5 o 6, en los que dichos compuestos candidatos se seleccionan de entre unos ligandos naturales de dicho canal potásico, unas moléculas químicas, unos aptámeros, unos péptidos y unos anticuerpos.



**FIG.1**



**FIG.2**



**FIG.3**

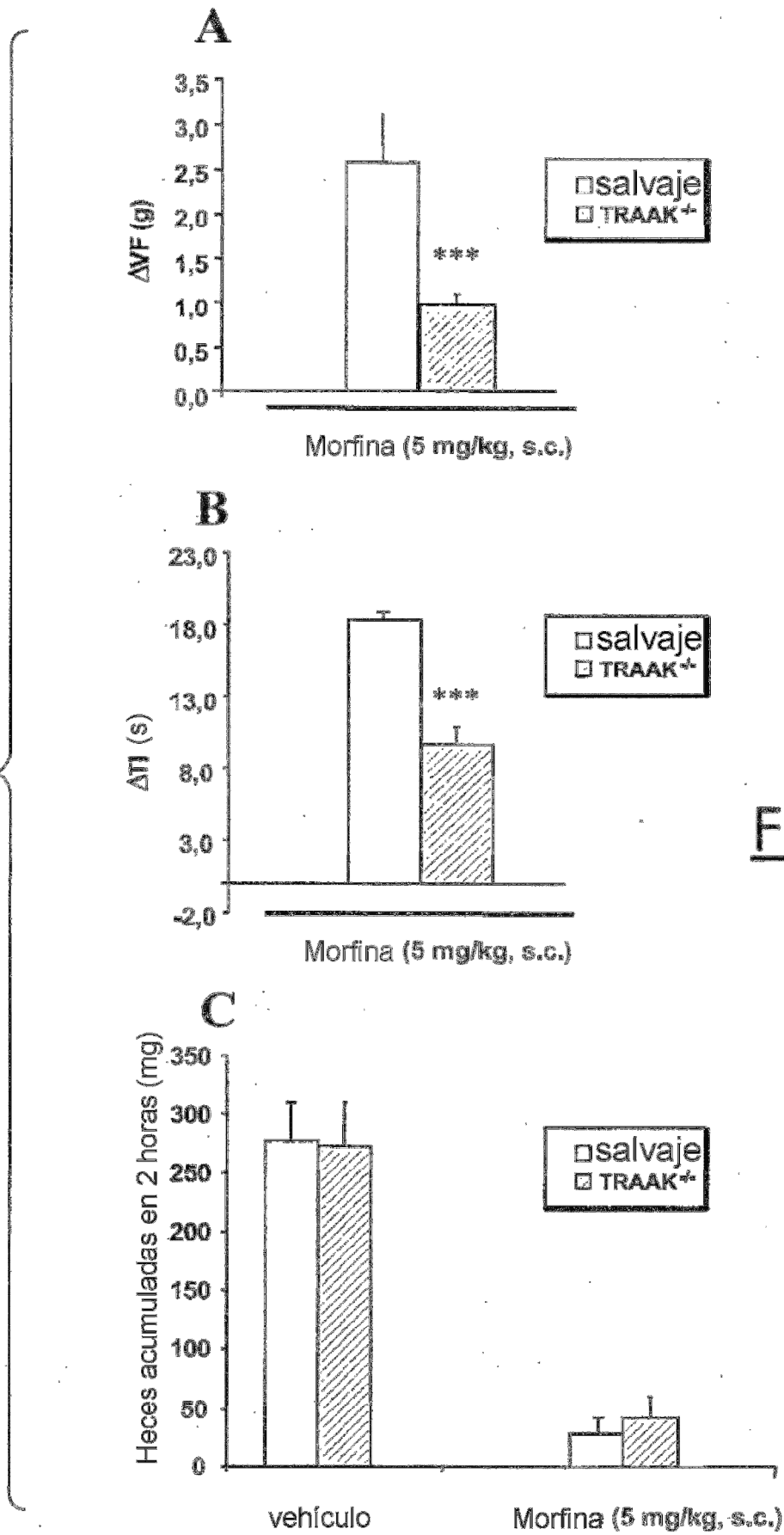


FIG.4